

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MICHAEL LANDTHALER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Antitumorale und antiangiogenetische Effekte von  
Biomodulatoren beim malignen Melanom und  
Angiosarkom**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

VORGELEGT VON  
ANIKA CHRISTIN BUNDSCHERER

2008



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR DERMATOLOGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MICHAEL LANDTHALER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Antitumorale und antiangiogenetische Effekte von  
Biomodulatoren beim malignen Melanom und  
Angiosarkom**

INAUGURAL-DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

VORGELEGT VON  
ANIKA CHRISTIN BUNDSCHERER

2008

III

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Vogt
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Edward Geissler
Tag der mündlichen Prüfung:	26.02.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	Melanom	4
1.2	Neue Strategien in der palliativen Tumorthherapie	5
1.3	Fragestellung und Ziel der Arbeit	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>9</b>
2.1	Laborgeräte	9
2.2	Verbrauchsmaterial	9
2.3	Chemikalien	10
2.4	Testkits	11
2.4.1	RNeasy® Mini Kit (Qiagen)	11
2.4.2	Reverse Transcription System (Promega)	11
2.4.3	Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems)	11
2.4.4	alarmarBlue™ Assay (Biosource)	12
2.4.5	Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega)	12
2.4.6	Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche Applied Science)	12
2.5	Medikamente	13
2.5.1	Pioglitazon und Celecoxib	13
2.5.2	Rapamycin	14
2.5.3	Medikamentenkombinationen	15
2.6	Zelllinien	15
2.7	Zellkulturmedien	17
2.8	Mäusestämme	17
2.8.1	SCID Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland)	17
2.8.2	Nackt-Mäuse (nu/nu)	17
2.8.3	Immunkompetente Stämme	17
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1	Zellkultur	18
3.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen	18
3.1.2	Passagieren der Zellen	18
3.1.3	Kryokonservierung und Auftauen der Zelle	18
3.1.4	Zellzahlbestimmung und Aussäen der Zellen in Multititerplatten	19

<b>3.2 TaqMan<sup>®</sup> real time RT-PCR</b>	<b>20</b>
3.2.1 RNA-Isolation	21
3.2.2 Synthese von cDNA aus RNA	22
3.2.3 Quantitative real time PCR (TaqMan <sup>®</sup> )	23
<b>3.3 Messung der Zellproliferation</b>	<b>25</b>
3.3.1 alamarBlue <sup>™</sup> Assay (Biosource)	26
3.3.2 Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche Applied Science)	28
<b>3.4 Untersuchung der Apoptoserate</b>	<b>30</b>
3.4.1 Beschreibung des Caspase-Glo <sup>®</sup> 3/7 Assay (Promega)	30
3.4.2 Versuchsaufbau	30
3.4.3 Versuchsprotokoll	31
3.4.4 Auswertung	31
<b>3.5 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse</b>	<b>32</b>
3.5.1 Testprinzip (21)	32
3.5.2 Versuchsprotokoll	34
<b>3.6 Angiogenese-Assays</b>	<b>35</b>
3.6.1 Ex vivo rat aortic ring assay	35
3.6.2 Tubular formation assay	36
<b>3.7 Statistik</b>	<b>38</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>4.1 COX 2 und PPAR<math>\gamma</math> mRNA Expressionsanalyse</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Melanom</b>	<b>40</b>
4.2.1 Untersuchung der Zellproliferation	40
4.2.2 Zellzyklusanalyse	50
4.2.3 Induktion der Apoptose	52
<b>4.3 Angiosarkom</b>	<b>53</b>
4.3.1 Antiproliferative Effekte von Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon	53
4.3.2 Induktion der Apoptose	58
4.3.3 Propagation von Angiosarkomen in immundefizienten Mäusen	59
<b>4.4 Angiogeneseassays</b>	<b>61</b>
4.4.1 Rat aortic Ring assay	61
4.4.2 Tubular formation Assay	62

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
	<b>5.1 PPAR<math>\gamma</math> Agonisten</b>	<b>68</b>
	5.1.1 PPAR $\gamma$ und dessen Rolle im Stoffwechsel (8, 27)	68
	5.1.2 Mechanismus der transkriptionellen Transaktivierung	68
	5.1.3 Direkte antitumorale Effekte der Glitazone	69
	<b>5.2 mTOR Antagonisten</b>	<b>73</b>
	5.2.1 Der mTOR Rezeptor und seine Antagonisten	73
	5.2.2 Direkte antitumorale Effekte der mTOR Antagonisten	74
	<b>5.3 COX 2 Inhibitoren</b>	<b>78</b>
	5.3.1 COX 2 und ihre Funktion	78
	5.3.2 Rolle der COX 2 im Tumor	79
	5.3.3 Direkte antitumorale Effekte der COX 2 Inhibitoren	79
	5.3.4 COX2 unabhängige Effekte der COX 2 Inhibitoren	80
	<b>5.4 Effektive Medikamentenkonzentrationen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></b>	<b>81</b>
	<b>5.5 Stromaorientierte Tumorthherapie</b>	<b>84</b>
	5.5.1 Grundlagen der Stromaorientierten Tumorthherapie	84
	5.5.2 Antiangiogenetische Therapie	85
	<b>5.6 Das Angiosarkom</b>	<b>89</b>
	<b>5.7 Kombinationstherapie</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>110</b>
	<b>8.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>110</b>
	<b>8.2 Lebenslauf</b>	<b>111</b>
	<b>8.3 Danksagung</b>	<b>111</b>
	<b>8.4 Publikationen</b>	<b>113</b>

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Melanom**

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der vom melanozytären Zellsystem ausgeht. Melanome manifestieren sich überwiegend an der Haut, wobei beim Mann der Rumpf und bei der Frau die untere Extremität besonders häufig betroffen sind. 5- 10% aller Melanome treten in erblich belasteten Familien auf (1). Als exogene Einflussgröße für die Entstehung eines Melanoms spielt eine intermittierende intensive UV-Exposition, insbesondere schwere Sonnenbrände in der Jugend, eine zentrale Rolle (2).

In den letzten Jahrzehnten ist die Inzidenz des Melanoms gerade in hellhäutigen Bevölkerungsgruppen dramatisch gestiegen. Während sich die Melanominzidenz in Süddeutschland von 1976 bis 2003 etwa verdreifachte, konnte im gleichen Zeitraum eine Abnahme der Mortalität beobachtet werden (3). Diese Divergenz ist dadurch zu erklären, dass derzeit 90% aller malignen Melanome als Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung diagnostiziert werden. In diesem Stadium der Erkrankung beträgt die tumorspezifische 10-Jahres-Überlebenwahrscheinlichkeit im Gesamtkollektiv ca. 75-80%. Im Verhältnis zur Tumormasse zeigt das Melanom jedoch eine frühe Tendenz zur Metastasierung. Für Patienten mit regionären Metastasen wird die 10-Jahres-Überlebensrate mit 20-50% angegeben, liegen bereits Fernmetastasen vor ist die Prognose zumeist infaust. Insgesamt ist das maligne Melanom für etwa 90% der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich (1).

Die Therapie des primären Melanoms besteht in der Exzision des Primärtumors mit ausreichendem Sicherheitsabstand, zusätzlich wird eine Entfernung des Wächterlymphknotens empfohlen. Postoperativ sollte allen Patienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko eine adjuvante Immuntherapie mit Interferon  $\alpha$  angeboten werden (1).

Eine systemische Behandlung mit Zytostatika ist erst bei inoperablen Rezidivtumoren, inoperablen regionären Metastasen und Fernmetastasen indiziert. Gerade im Stadium der Fernmetastasierung ist die Prognose bei einer medianen Überlebenszeit von 6 - 9 Monaten infaust, so dass eine Chemotherapie überwiegend unter palliativen Gesichtspunkten erfolgt. Hauptziel der Therapie ist dann nicht so sehr die Verlängerung des Überlebens sondern die der beschwerdefreien Zeit sowie die Erhaltung der Lebensqualität.



## 1.2 Neue Strategien in der palliativen Tumorthherapie

Die Therapie des fortgeschrittenen Melanoms stellt nach wie vor eine große Herausforderung in der Dermatookologie dar. Eine zytostatische Chemotherapie liefert bei der Behandlung fortgeschrittener Tumorerkrankungen oft nur unbefriedigende Ergebnisse. Ziel der konventionellen Chemotherapie ist es, durch Induktion von DNA-Schäden oder Inhibition des Zellstoffwechsels möglichst viele Tumorzellen zu eliminieren. Chemotherapeutika werden dazu in der höchstmöglichen Dosierung („maximal tolerated dose“) eingesetzt. Dadurch dass dabei unspezifisch alle Zellen mit hoher Proliferationsrate geschädigt werden, ist diese Behandlung mit erheblichen akuten Nebenwirkungen wie Knochenmarksuppression und Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut verbunden. Um eine Regeneration dieser Zellen zu ermöglichen, müssen zwischen den Therapiezyklen mehrwöchige Pausen eingelegt werden. Problematisch ist dabei, dass dadurch gleichzeitig auch den Tumorzellen und deren versorgenden Gefäßen Zeit zur Regeneration gegeben wird. Die initiale Ansprechrate von Melanomen auf eine Hochdosis-Chemotherapie ist zwar in Einzelfällen recht beeindruckend, jedoch in der Mehrzahl der Fälle nicht von Dauer. Aufgrund ihrer genetischen Instabilität sind die Tumoren zudem in der Lage, chemoresistente Zellklone zu entwickeln, die durch weitere Therapiezyklen nicht mehr erreicht werden können und zu einem raschen Progress der Erkrankung führen. Aggressivere Schemata mit Kombination mehrerer toxischer Substanzen, einer Potenzierung möglicher Nebenwirkungen und einer Verschlechterung der Lebensqualität führen zu einer leichten Steigerung der Ansprechrate, nicht aber des Überlebens. Daher rührt die Suche nach neuen Therapiestrategien mit nicht-toxischen Biomodulatoren, die in der palliativen Onkologie eine Alternative zur konventionellen Chemotherapie darstellen könnten.

Interessanterweise besitzen einige primär nicht-onkologisch indizierte, nicht zytotoxische Medikamente antitumorale Eigenschaften. In dieser Arbeit sollte dies daher am Beispiel antineoplastischer Effekte von mTOR Antagonisten (Rapamycin), COX 2 Inhibitoren (Coxibe) und PPAR $\gamma$  Agonisten (Glitazone) am Beispiel des malignen Melanoms und des Angiosarkoms genauer untersucht werden.

Der mTOR Antagonist Rapamycin ist ein Immunsuppressivum, das in der Transplantationsmedizin eingesetzt wird um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Während der präklinischen Evaluation konnten zusätzlich antitumorale Effekte beobachtet werden (4). In einem Komplex mit seinem Immunophilin FKBP 12 inhibiert Rapamycin die

Aktivität des mammalian target of Rapamycin (mTOR), einer atypischen Serin-Threonin-Kinase, die in der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben der Zelle eine zentrale Rolle spielt. Eine Hemmung der mTOR Funktion führt zu Inhibition des Zellwachstums, Zellzyklusarrest und Reduktion der Proteinsynthese (5).

Celecoxib gehört zur Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und hemmt selektiv die Aktivität der Cyclooxygenase 2. Aufgrund seiner analgetischen und antiphlogistischen Wirkung wird Celecoxib klinisch zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis und degenerativer Gelenkerkrankungen verwendet (6). COX 1 und COX 2 sind Isoformen der Cyclooxygenase, einem Enzym, das die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysiert. Während die COX 1 in vielen Geweben konstitutiv exprimiert ist und hauptsächlich für die physiologische Prostaglandinsynthese verantwortlich ist, ist die COX 2 als schnell induzierbares Enzym in pathologische Prozesse wie Entzündung und Schmerzempfinden involviert (7). Für die Gruppe der NSAR und speziell für selektive COX 2 Inhibitoren konnten direkte antitumorale Effekte wie die Induktion der Apoptose und Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden.

Thiazolidindione wie Pioglitazon sind Agonisten des peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), einem nukleären Hormonrezeptor, der in der Regulation des Glukosestoffwechsels und der Lipid-Homöostase eine entscheidende Position einnimmt. Als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor bildet PPAR $\gamma$  mit dem Retinoid X Rezeptor RXR Heterodimere und antwortet auf extrazelluläre Stimuli mit der Regulation der Genexpression (8). Da die Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Serumglukosekonzentration reduziert, wurden PPAR $\gamma$  Agonisten wie Pioglitazon, Ciglitazon und Rosiglitazon zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 entwickelt (9). Neben ihrer insulinsensibilisierenden Wirkung zeigen die Thiazolidindione wie die mTOR Antagonisten und Coxibe z.B. auch antiproliferative Effekte.

Über die direkten Effekte auf die Tumorzellen wie Induktion der Apoptose und Inhibition der Proliferation hinaus konnten für diese Substanzgruppen auch eine Modulation des peritumoralen *Stromas* im Sinne von immunaugmentierenden und antiangiogenetischen Effekten nachgewiesen werden, die unter Umständen ein erhebliches Potential für die Palliation haben. Zwischen Tumor und umgebenden Stroma besteht eine für das Tumorstadium essentielle Wechselbeziehung. Malignome sind in der Lage das umgebende Gewebe so zu verändern, dass optimale Bedingungen für Wachstum, Invasion und Metastasierung entstehen (10). Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich das Kon-

zept der „stromaorientierten Tumorthherapie“, dessen Ziel darin besteht, die Tumor-Stroma-Interaktion zu unterbrechen. Diese innovative Therapiestrategie zielt nicht in erster Linie auf die Tumorzellen selbst, sondern auf peritumorale Stromazellen wie Fibroblasten, immunologisch aktive Zellen und insbesondere Endothelzellen des Tumorgefäßbettes. Da diese Zellen im Vergleich zu Tumorzellen genetisch stabiler sind wird postuliert, dass die Gefahr der Resistenzentwicklung bei einem gezielten Angriff auf die Stromazellen geringer ist als bei der klassischen Chemotherapie. Wichtig ist, dass die Stromazellen in ihrem Genexpressionsmuster durchaus von normalen Körperzellen so abweichen, dass ein selektiver Angriff auf das Tumorstroma ermöglicht wird. Von der Kombination verschiedener Wirkstoffe verspricht man sich super-additive Effekte und somit ein erhebliches antitumorales Potential bei geringem Nebenwirkungsprofil, da bei diesem Ansatz mit nicht-toxischen Medikamenten gearbeitet wird. Zusätzlich stellt die metronome, also täglich niedrig dosierte Gabe von klassischen Chemotherapeutika, bei der die Medikamentenkonzentrationen im subtoxischen Bereich liegen, eine weitere Alternative da, um die antiangiogenetische Wirkung zusätzlich zu unterstützen. In zahlreichen präklinischen Studien konnte die Wirksamkeit von mTOR Antagonisten, COX 2 Inhibitoren und PPAR $\gamma$  Agonisten in der Tumorthherapie schon belegt werden. Die Ergebnisse von klinischen Studien ermutigen dazu, die direkten und indirekten antineoplastischen Effekte dieser Biomodulatoren weiter zu verfolgen. Modellhaft für die angiogenen Stromafunktionen wurden dafür in dieser Arbeit nicht nur Effekte auf Tumorzellen direkt, sondern auch auf Endothelien (tubular formation assay und rat aortic ring assay) sowie – als Modell für alteriertes Endothel – immortalisierte Angiosarkomzelllinien untersucht.

### **1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

In dieser Arbeit wurde die direkte antitumorale Wirkung von Rapamycin, Celecoxib und Pioglitazon auf Melanom- und Angiosarkomzelllinien *in vitro* untersucht. Hierzu wurde der Einfluss der Medikamente und ihrer Kombinationen auf die 1) Zellproliferation 2) Induktion der Apoptose und 3) Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen beurteilt. Durch die Kombination der Einzelsubstanzen sollten mögliche antiproliferative und proapoptotische Effekte optimiert werden. Weiterer Gegenstand der Arbeit war es zu überprüfen, ob die Wirkung von Celecoxib und Pioglitazon vom COX 2 und PPAR $\gamma$  Expressionsmuster der Zelle abhängen, was das Indikationsspektrum unter Umständen stark limitieren würde. Das antiangiogenetische Potential von Rapamycin und Celecoxib wurde mit Hilfe des tubular formation assays untersucht. Zur Etablierung von Angiosarkomzelllinien mit verbesserten Wachstumseigenschaften wurden die Ausgangskulturen der Angiosarkomzelllinien zusätzlich in immundefizienten Mäusen propagiert.

## **2 MATERIAL**

### **2.1 Laborgeräte**

#### **Laborgerät**

Brutschrank Hera Cell  
Deckgläser für Haemocytometer  
Durchflusszytometer FACSCalibur  
Glaspipetten 1, 2, 5, 10, 20 ml  
Haemocytometer Neubauer Improved Bright-  
line  
LamiAir<sup>®</sup> Hb 2472  
Mikroskop Colour view 12  
Mikroskop Labovort FS  
Multilablereader Mithras LB 940  
Multipipette Microman<sup>®</sup> precision microtiter  
Pipette  
Peltier Thermal Cycler  
Pipette Handy Stan  
Pipetten 10-100, 200 1000µl  
Pipettus Easypet  
REAX TOP  
Schüttler IKA-Vibrax-VXR  
Transferpipette<sup>®</sup> -12, 20-200µl  
Zentrifuge mini spin  
Zentrifuge Multifuge 3S-R

#### **Firma**

Heraeus, Osterode  
Menzel-Gläser<sup>®</sup>, Braunschweig  
BD Biosciences, Heidelberg  
Brand, Wertheim  
Superior, Marienfeld  
  
Heraeus, Osterode  
Leica Microsystems, Wetzlar  
Leitz, Wetzlar  
Berthold technologies, Bad Wildbad  
Gilson, Middleton, USA  
  
Bio-Rad, München  
Brand, Wertheim  
Eppendorf, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Heidolph, Nürnberg  
Janke & Kunkel, Staufen i. Br.  
Brand, Wertheim  
Eppendorf, Hamburg  
Heraeus, Osterode

### **2.2 Verbrauchsmaterial**

5ml Polystyrene Round bottom Tube  
96 Well Cell Culture Cluster  
Easy Grip<sup>TM</sup> Tissue Culture Dish  
Flüssigkeitsreservoirs steril 55 ml  
Gefrieröhrchen Freezing Vials 2,0 ml  
Multiwell<sup>TM</sup> 24 Well  
Optiplat<sup>TM</sup>-96

BD Biosciences, Heidelberg  
Corning Costar, Bodenheim  
BD Biosciences, Heidelberg  
Roth, Karlsruhe  
Sigma Aldrich, Steinheim  
BD Biosciences, Heidelberg  
PerkinElmer, Waltham, USA

Parafilm „M“ Laboratory film	Pechiney Plastic Packing, Chicago
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 10, 200, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 100µl/ 1000µl	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen Combitips plus 1, 5, 10ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen SafeSeal-Tips® Premium 1, 10, 200µl	BIOZYM, Oldenburg
Pipettierhilfe Pipetman	Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
PP-Test tubes 15 und 50 ml steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 2 ml	BIOZYM, Oldenburg
Waagschalen Weighing boats size 7	Sigma aldrich, Steinheim
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup> und 75cm <sup>2</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.3 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
BD BioCoat™ Matrigel™ Cellware Thin Layer	BD Biosciences, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS 1x, ohne Ca, Mg,	PAA Laboratories, Cölbe
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck, Darmstadt
Ethylendiamine-Tetraacetic-acide (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal bovine serum (FKS)	PAN, Aidenbach
Gibco™ L-Glutamin, 200mM 100x	Invitrogen, Carlsbad, CA
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, CA
Gibco™ Trypsin-EDTA 5% 10x	Invitrogen, Carlsbad, CA
Matrigel™ Basement Membrane Matrix	BD Biosciences, Heidelberg
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Nuclease-free-water	Promega, Madison, USA
Propidium-Iodid 1mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rnase A 100mg/ml	Quiagen, Hilden
RNase Zap®	Ambion®, Applied Biosystem, Darmstadt
Trypan Blau 0,5% (w/v)	Biochrom, Berlin

## 2.4 Testkits

### 2.4.1 *RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen)*

Inhalt:

- RNeasy Mini Säulen
- QIAshredder Säulen
- 1,5ml und 2ml Sammelgefäße
- RNase-freies Aqua dest.
- Puffer: RLT, RLC, RW1 und RPE (konzentriert)

Lagerung: bei Raumtemperatur

### 2.4.2 *Reverse Transcription System (Promega)*

Inhalt:

- AMV Reverse Transkriptase
- RNasin<sup>®</sup> Ribonucleaseinhibitor
- Random Primer
- dNTP Mixtur
- Reverse Transkription 10x Puffer
- MgCl<sub>2</sub> 25mM
- Nuclease-freies Wasser

Lagerung: bei -20°C

### 2.4.3 *Assay-on-Demand<sup>™</sup> (Applied Biosystems)*

PPAR $\gamma$ : HS 00234592 ml

COX 2: HS 00153133 ml

#### 2.4.4 alamarBlue<sup>TM</sup> Assay (Biosource)

gebrauchsfertige Lösung

Lagerung: bei 4°C

Zubereitung:

⇒ Vor Gebrauch auf Raumtemperatur equilibrieren und durch Schütteln mischen

#### 2.4.5 Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay (Promega)

Inhalt: Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Substrat und Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Puffer

Lagerung: bei -20°C

Zubereitung:

⇒ beide Reagenzien auf Raumtemperatur equilibrieren

⇒ Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Substrat in Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Puffer auflösen und gut mischen

#### 2.4.6 Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche Applied Science)

Der Cell Proliferation Elisa BrdU Assay besteht aus mehreren Einzelkomponenten, deren Zubereitung und Lagerung in Tabelle 2.1 zusammengefasst sind.

Lösung	Zubereitung	Lagerung
<b>BrdU labeling solution</b>	1:100 mit sterilem Kulturmedium verdünnen	Lichtgeschützt bei 2-8°C
<b>Anti-BrdU-POD Stammlösung</b>	In 1,1 ml 2x destilliertem H <sub>2</sub> O lösen ⇒ 10 min kräftig mischen	Lichtgeschützt bei 2-8°C
<b>Anti-BrdU-POD Arbeitslösung</b>	Stammlösung 1:100 mit antibody dilution solution verdünnen	Immer frisch ansetzen
<b>Waschlösung</b>	Waschpuffer 1:10 in 2x destilliertem H <sub>2</sub> O verdünnen	Bei 2-8°C

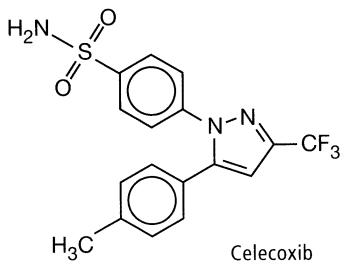
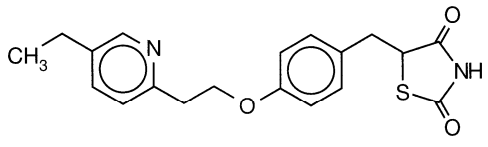
**Tabelle 2.1** Bestandteile und Zubereitung des BrdU Assays



## 2.5 Medikamente

### 2.5.1 Pioglitazon und Celecoxib

Pioglitazon (Actos®) wurde freundlicherweise von Takeda Pharma, Celecoxib (Celebrex®) von Pfizer zur Verfügung gestellt. Beide Medikamente lagen als Reinsubstanz in Pulverform vor. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit wurden beide Medikamente in 100% DMSO aufgelöst und die so entstandenen Stammlösungen mit Kulturmedium auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt (siehe Tabelle 2.3). Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Verdünnung von DMSO in Kulturmedium behandelt. Die DMSO Endkonzentration betrug bei allen Versuchen höchstens 1%. Die Medikamentenverdünnungen wurden für jeden Versuch frisch angesetzt.

Medikament	Celecoxib	Pioglitazon
Strukturformel	 Celecoxib	 Pioglitazon (ACTOS®)
Handelsname	Celebrex®	Actos®
Firma	Pfizer	Takeda Pharma
Molare Masse	381,38g/mol	392,91g/mol
SL-Konzentration	10mM	10mM
Masse	22,88mg	23,55mg
DMSO	6ml	6ml

**Tabelle 2.2** Chemische Eigenschaften und Herstellung der Stammlösungen von Celecoxib und Pioglitazon, Strukturformeln aus Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage.

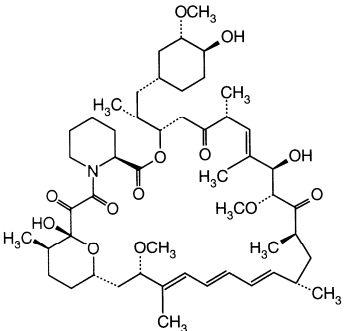
	Konzentration	Volumen aus Konzentration	Volumen Medium
I	100µM	0,5ml aus SL	49,5ml
II	10µM	5ml aus I	45ml
III	1µM	5ml aus II	45ml
IV	0,1µM	5ml aus III	45ml
V	0,01µM	5ml aus IV	45ml

	Konzentration	Volumen aus Konzentration	Volumen Medium
<b>I</b>	100µM	500µl aus SL	49,5ml
<b>II</b>	80µM	400µl aus SL	49,6ml
<b>III</b>	60µM	300µl aus SL	49,7ml
<b>IV</b>	40µM	200µl aus SL	49,8ml
<b>V</b>	20µM	100µl aus SL	49,9ml
<b>VI</b>	10µM	5ml aus I	45,0ml

**Tabelle 2.3** Verdünnungsreihen für Celecoxib und Pioglitazon, SL= Stammlösung

### 2.5.2 Rapamycin

Rapamycin (Rapamune®) wurde von Wyeth gekauft und lag in einer Lösung mit  $\beta=1\text{mg/ml}$  vor. Die Verdünnung auf die jeweilige Endkonzentration erfolgte mit Kulturmedium. Als Negativkontrollen wurden die Zellen in allen Versuchen mit reinem Kulturmedium behandelt. Die Medikamentenverdünnungen wurden für jeden Versuch frisch angesetzt.

Rapamycin		
<b>Handelsname</b>	Rapamune®	
<b>Firma</b>	Wyeth	
<b>Molare Masse</b>	914,9g/mol	
<b><math>\beta</math></b>	1mg/ml	
<b>SL-Konzentration</b>	10µM	
<b>Volumen Rapamycin</b>	230µl	
<b>Volumen Medium</b>	24,77ml	

**Tabelle 2.4** Chemische Eigenschaften und Herstellung der Stammlösung von Rapamycin, Strukturformel aus Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. Auflage

	Konzentration	Volumen aus Konzentration	Volumen Medium
<b>II</b>	10µM	5ml aus SL	45ml
<b>III</b>	1µM	5ml aus I	45ml
<b>IV</b>	0,1µM	5ml aus II	45ml
<b>V</b>	0,01µM	5ml aus III	45ml

	Konzentration	Volumen aus Stammlösung	Volumen Medium
<b>I</b>	1µM	5ml	45ml
<b>II</b>	0,8µM	4ml	46ml
<b>III</b>	0,6µM	3ml	47ml
<b>IV</b>	0,4µM	2ml	48ml
<b>V</b>	0,2µM	1ml	49ml

**Tabelle 2.5** Verdünnungsreihe für Rapamycin, SL= Stammlösung

### 2.5.3 Medikamentenkombinationen

Neben den Einzelsubstanzen wurden in dieser Arbeit auch die Kombinationen aus zwei oder allen drei Substanzen untersucht. Tabelle 2.6 gibt die Verdünnungsreihen an. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit den jeweiligen DMSO-Verdünnungen behandelt.

Kombination	Rapamycin	Celecoxib	Pioglitazon	DMSO-Kontrolle
<b>Rapa 0,5 µM + Cele 50µM</b>	25ml aus 1µM	25ml aus 100µM	-	50µM
<b>Rapa 0,5µM + Pio 50 µM</b>	25ml aus 1µM	-	25ml aus 100µM	50µM
<b>Cele 50 µM + Pio 50 µM</b>	-	25ml aus 100µM	25ml aus 100µM	100µM
<b>Rapa 0,5µM + Cele 50µM + Pio 50µM</b>	15ml aus 1,5µM	15ml aus 150 µM	15ml aus 150µM	100µM

**Tabelle 2.6** Herstellung der Medikamentenkombinationen aus Celecoxib (Cele), Pioglitazon (Pio) und Rapamycin (Rapa).

## 2.6 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden sechs humane Melanom-, zwei humane und eine murinphänotypische Angiosarkom- und eine humane Endothelzelllinie verwendet. Die Melanomzelllinien A375 P und A375 SM sind isogene A375-Varianten mit geringem (P, poor) und hohem (SM, strong metastatic) Metastasierungspotential. Sie wurden durch wiederholte Zyklen von Injektionen in die Schwanzvene athymischer Balb/c Nacktmäuse und Subkultivierung der Zellen aus den entstandenen Lungenmetastasen hergestellt (11). Die Etablierung der murinphänotypischen Angiosarkomzelllinie ISOS 1 erfolgte durch die subkutane Transplantation eines humanen Angiosarkoms in den Rumpf von SCID-Mäusen und die spätere subkutane oder intraperitoneale Inokulation der Zelllinie in weitere SCID-Mäuse (12). Die aus einer humanen Nabelschnur etablierten Zelllinie HUVEC wurde freundlicherweise von der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie zur Verfügung gestellt. Alle Zellen wachsen adhärent und wurden in T<sub>75</sub> Zellkulturflasche kultiviert. Tabelle 2.7 fasst Wachstumseigenschaften, Zellkulturbedingungen und Ursprung der Zelllinien zusammen.

Zelllinie	Zellart	Ursprung	Medium	CO <sub>2</sub>	Subkulturen	Referenz
<b>ASM</b>	AS	Skalp, ♂, 80J	ECGM	5%	1:2- 1:3	Krump- kovalinkova, 2003 (13)
<b>Iso Has</b>	AS	Skalp, ♂, 84J	ECGM	5%	1:2- 1:3	Masuzawa, 1999 (14)
<b>ISOS 1</b>	Murin- phänotypisches AS	Skalp, ♂, 84J	ECGM	5%	1:2- 1:10	Masuzawa, 1998 (12)
<b>HUVEC</b>	E	Nabelschnur	ECGM	5%	1:3- 1:20	
<b>A375</b>	MM	♀, 54J	RPMI	8%	1:5- 1:20	Giard, 1973 (15)
<b>A375 P und SM</b>	MM	Isogene A375- Varianten	RPMI	8%	1:5- 1:20	Gehlsen, 1992 (11)
<b>Colo 849</b>	MM-Metastase	axillärer LK, ♂, 43J	RPMI	5%	1:4 - 1:10	Morse, 1993 (16)
<b>IGR 1</b>	MM-Metastase	inguinaler LK, ♂, 42J	DMEM	5%	1:5- 1:10	Aubert, 1980 (17)
<b>Mel Ho</b>	Primäres MM	?	RPMI	5%	1:5- 1:10	Holzmann 1988 (18)

**Tabelle 2.7:** Charakterisierung aller verwendeten humanen Zelllinien, AS = Angiosarkom, MM = malignes Melanom, E = Endothelzellen, LK = Lymphknoten. RPMI = RPMI 1640 Kulturmedium, DMEM = Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, ECGM = Endothelial Cell Growth Medium MV.

## 2.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Tabelle 2.8 fasst die Inhaltsstoffe der drei verwendeten Kulturmedien RPMI 1640, DMEM und ECGM zusammen.

Medium	FKS	Glukose	PS	LG	Phenolrot	NaHCO <sub>3</sub>	Firma
RPMI 1640	10%	2 g/l	+	+	-	2,0 g/l	PAN
DMEM	10%	4,5 g/l	+	+	-	3,7 g/l	PAN
ECGM	5%	?	-	-	+	?	PromoCell

**Tabelle 2.8** Zellkulturmedien mit Inhaltsstoffen. DMEM = Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium, ECGM = Endothelial Cell Growth Medium MV, FKS = foetales Kalbsserum, PS = Penicillin-Streptomycin, LG = L-Glutamin, ? = keine Angaben des Herstellers.

Das Endothelzellmedium (Endothelial cell growth medium MV, PromoCell) enthält zusätzlich 0,4% ECGS/H, Epidermal Growth Factor 10ng/ml und Hydrocortison 1µg/ml. Zur Kultivierung der HUVEC Zellen wurden die Zellkulturflaschen zusätzlich mit Gelatine beschichtet.

## 2.8 Mäusestämme

### 2.8.1 SCID Mäuse (*Charles River, Sulzfeld, Deutschland*)

SCID Mäuse zeigen eine schwere kombinierte Immundefizienz, so dass die Funktion der B- und T-Lymphozyten beeinträchtigt ist.

### 2.8.2 Nackt-Mäuse (*nu/nu*)

Aufgrund besserer Verfügbarkeit werden zur Propagation von humanen Tumoren Nacktmäuse verwendet. Hierbei handelt es sich um athymische Mäuse mit T-Zellen-Defizienz.

#### Verwendete Nacktmäusestämme:

Balb/c nu/nu: Inzuchtstamm (Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

NMRI nu/nu: Auszuchtstamm (Zucht an der Universität Regensburg, Dr. T. Spruss)

### 2.8.3 Immunkompetente Stämme

Balb/c: Immunkompetenter Inzuchtstamm

NMRI: Immunkompetenter Auszuchtstamm

## **3 METHODEN**

### **3.1 Zellkultur**

#### ***3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen***

Alle verwendeten Zellen wachsen adhärent und bilden einen Zellrasen. Die Zellen wurden in T<sub>75</sub> Zellkulturflaschen in befeuchteter Atmosphäre bei 37°C und 5% bzw. 8% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Um einer eventuellen Kontamination durch Pilze oder Bakterien vorzubeugen wurden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen Zellkulturbank durchgeführt. Arbeitsfläche und Werkzeuge wurden vor Gebrauch mit 70% Ethanol gereinigt und nur sterilisierte Pipetten, Medien und Verbrauchsmaterialien verwendet. Wenn nicht anders beschrieben wurden alle Lösungen vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

#### ***3.1.2 Passagieren der Zellen***

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden konfluente Zellen alle 2-3 Tage von der Zellkulturflasche gelöst und in geringerer Dichte wieder ausgesät. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen um Reste des FKS-haltigen Kulturmediums zu entfernen, da diese die Wirkung des Trypsins inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml Trypsin-EDTA (5%) behandelt und bis zum Ablösen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Abrunden und Ablösen der Zellen wurden unter dem Mikroskop kontrolliert. Da eine zu lange Inkubation mit Trypsin-EDTA irreversible Schädigungen der Zellen hervorrufen kann, wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5ml FKS-haltigem Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml- Röhrchen überführt und für 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 10ml Kulturmedium resuspendiert und je nach Zellart im Verhältnis 1:2 bis 1:20 auf mit 10ml Medium vorbereitete Zellkulturflaschen verteilt. Falls die Zellen nach 2-3 Tagen noch keine Konfluenz erreicht hatten, wurde nur das Kulturmedium gewechselt. Hierfür wurde das alte Medium abgesaugt und durch 10-15ml frisches Kulturmedium ersetzt.

#### ***3.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zelle***

Die Zellen wurden im gefrorenen Zustand bei -196°C in flüssigem N<sub>2</sub> aufbewahrt. Zur Kryokonservierung wurden zu 80% konfluente Zellen mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und für 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde

das Zellpellet in kaltem, steril filtriertem Gefriermedium (Kulturmedium mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert, je 1ml der Zellsuspension in ein Gefrierröhrchen gefüllt und das Röhrchen sofort auf Eis gestellt. Die eingefrorenen Zellen wurden zunächst für 1 Woche bei -80°C und anschließend bei -196°C in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert. Tiefgefrorene Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort vorsichtig in eine T<sub>25</sub> Zellkulturflasche mit 7ml Kulturmedium pipettiert. Um die Zellen ohne zeitliche Verzögerung bei 37°C im Brutschrank inkubieren zu können, wurde bewusst auf eine Zentrifugation zur Entfernung des DMSO aus dem Gefriermedium verzichtet. Nach 1-2 Tagen Inkubation im Brutschrank wurde das Kulturmedium gewechselt. Sobald die Zellen einen durchgehenden Zellrasen gebildet hatten, wurden sie in eine T<sub>75</sub> Zellkulturflasche umgesetzt. Hierfür wurden die Zellen abtrypsiniert, zentrifugiert, in 15ml Kulturmedium resuspendiert und die gesamte Zellsuspension in eine T<sub>75</sub> Zellkulturflasche pipettiert.

#### ***3.1.4 Zellzahlbestimmung und Aussäen der Zellen in Multititerplatten***

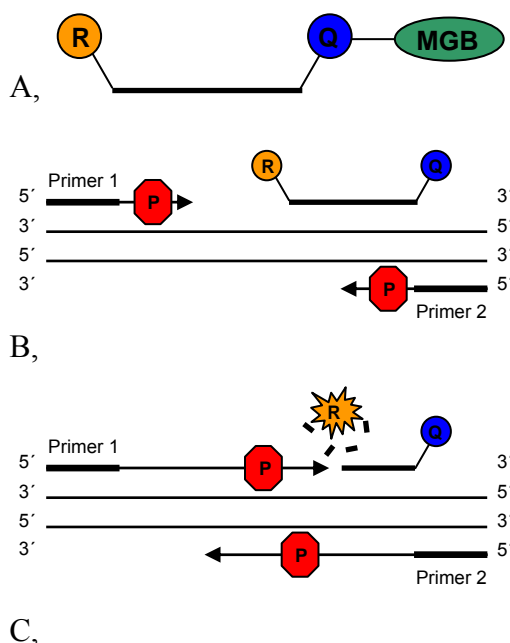
Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA von der Kulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in 10ml Kulturmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde ein Aliquot der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nach Auszählen von vier Feldern der Zählkammer wurde die Gesamtzellzahl in der Suspension nach folgender Formel berechnet:

$$Zellzahl = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + x_4}{4} \cdot 10 \cdot 10000,$$

wobei  $x_{1-4}$  der Zellzahl in den einzelnen Feldern der Neubauer-Kammer entspricht. Anschließend wurde je nach Größe der Multititerplatte das benötigte Volumen berechnet. Die Zellsuspension wurde durch auf- und abpipettieren nochmals gemischt, wenn nötig weiter verdünnt und mit einer Multipipette auf die Multititerplatte verteilt. Um die Zellen gleichmäßig in den Wells zu verteilen wurde die Platte vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde die Platte bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 3.2 TaqMan® real time RT-PCR

Die real time RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) ist eine Methode zur quantitativen Analyse der Genexpression. Isolierte mRNA wird zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die Amplifikation der DNA verwendet wird. Sich wiederholende Zyklen von Hitzedenaturierung der DNA, Bindung spezifischer Oligonukleotidprimer an die DNA und Extension der DNA zu neuen Doppelsträngen dienen der raschen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (19). Zusätzlich enthält der PCR-Ansatz eine ebenfalls genspezifische fluoreszenzmarkierte Sonde. Die Quantifizierung der DNA Menge erfolgt durch Fluoreszenzmessung am Ende jedes PCR-Zyklus, wobei das Fluoreszenzsignal zur Menge der PCR-Produkte direkt proportional ist. In dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase verwendet, eine thermostabile DNA Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, die neben einer 5' → 3' DNA Polymeraseaktivität zusätzlich eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität besitzt (20). Die verwendete TaqMan® MGB Sonde ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt. Sie enthält einen Reporter-Farbstoff am 5' Ende und einen nicht fluoreszierenden Quencher am 3' Ende. Bei intakter Sonde wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund seiner Nähe zum Quencher unterdrückt (Förster-resonance energy transfer, FRET). Während der DNA Amplifikation wird die Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert und somit der Reporter-Farbstoff vom Quencher getrennt. Das jetzt freigesetzte Fluoreszenzsignal ist ein direktes Maß für die Menge der entstandenen PCR-Produkte.



**Abbildung 3.1 Prinzip der TaqMan® RT-PCR**

**A,** Die TaqMan® Sonde enthält einen fluoreszierenden 6-FAM Reporter (R) am 5' Ende und am 3' Ende einen nicht fluoreszierenden Quencher (Q) sowie einen minor groove binder (MGB), der zur Erhöhung der Schmelztemperatur der Probe dient.

**B,** Annealing: Primer und TaqMan® Sonde binden spezifisch an komplementäre DNA-Sequenzen des Zielgens. Das Fluoreszenzsignal des Reporters wird durch die Nähe zum Quencher unterdrückt.

**C,** Hydrolyse der TaqMan® Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase. Durch Trennung von Reporter und Quencher wird das Fluoreszenzsignal freigesetzt.



### 3.2.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus verschiedenen Zelllinien erfolgte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Minikit (Qiagen).

Protokoll:

1. Medium aus Kulturflasche absaugen und Zellen mit PBS waschen.
2. Zur Zelllyse 600µl RLT Puffer zugeben und mehrfach über die Zellen laufen lassen
3. Zellen abschaben und die Puffer-Zellsuspension in ein 1,5ml Gefäß geben
4. max. 700µl auf QIAshredder geben  
⇒ 3min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren
5. Mit der Pipette Überstand 1:1 mit 70%igem Ethanol mischen
6. max. 700µl auf die RNeasy<sup>®</sup> Säule geben  
⇒ 15 sec. bei 10.000rpm zentrifugieren  
⇒ Flüssigkeit aus dem Gefäß verwerfen
7. 700µl RW<sub>1</sub> Puffer zum Waschen auf die Säule geben  
⇒ 30sec. bei 10.000rpm zentrifugieren  
⇒ Überstand verwerfen und RNeasy<sup>®</sup> Säule auf ein neues 2ml Gefäß geben
8. 500µl RPE-Puffer zum Waschen auf die Säule geben  
⇒ 15sec bei 10.000rpm zentrifugieren
9. nochmals mit 500µl RPE-Puffer waschen  
⇒ 2min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren  
⇒ Überstand mit dem Auffanggefäß verwerfen, dabei die trockene Membran nicht mit Flüssigkeit berühren
10. Säule auf ein frisches 1,5ml Gefäß geben  
⇒ 30µl RNase freies Aqua dest. direkt auf den Filter geben  
⇒ 1min inkubieren  
⇒ 1min bei 10.000rpm zentrifugieren
11. Säule verwerfen und das Gefäß mit der isolierten RNA auf Eis stellen
12. Photometrische Messung der RNA-Konzentration

### 3.2.2 Synthese von cDNA aus RNA

Im nächsten Schritt wird die gewonnene RNA mit Hilfe des Reverse Transcription Systems (Promega) in einsträngige cDNA umgeschrieben. Der Ansatz für den verwendeten Mastermix und das Protokoll sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst.

Mastermix-Zutaten	Menge	Konzentration / Masse
MgCl <sub>2</sub>	8µl	5mM
RT 10x Puffer	4µl	
dNTP Mix	4µl	1mM
Random Primer	1µl	1µg
RNasin® Ribonucleaseinhibitor	1,2µl	1 unit/µl
AMV Reverse Transcriptase	1µl	0,75 unit/µl
+ Zugabe 2µg RNA in sterilem H <sub>2</sub> O	20,8µl	
Gesamtvolumen	40µl	

**Tabelle 3.1:** Mastermix-Zutaten für Reverse Transkriptase Reaktion, beim Pipettieren wird die Reihenfolge der Reagenzien exakt befolgt.

Temperatur	Inkubationszeit
42°C	60min
95°C	5min
0°C	5min
-20°C	Lagerung

**Tabelle 3.2:** RT-PCR Konditionen

### 3.2.3 Quantitative real time PCR (TaqMan®)

#### 3.2.3.1 TaqMan®-Protokoll

Zur quantitativen Analyse der PPAR $\gamma$  und COX 2 Expression in humanen Zelllinien wurde jeweils mit Hilfe eines genspezifischen Assay-on-Demand™ (Applied Biosystems) eine TaqMan® real time PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das PCR-Protokoll für den ABI Prism 7900 HAT Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystems) sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 aufgeführt. Für jede Probe wurden 3-fach Bestimmungen im 384-Well Format durchgeführt.

Zutaten	Volumen
2x TaqMan® Universal Master Mix	10 $\mu$ l
TaqMan® Sonde Assay-on-demand™	1 $\mu$ l
steriles H <sub>2</sub> O	4 $\mu$ l
cDNA (1:5 verdünnt)	5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20<math>\mu</math>l</b>

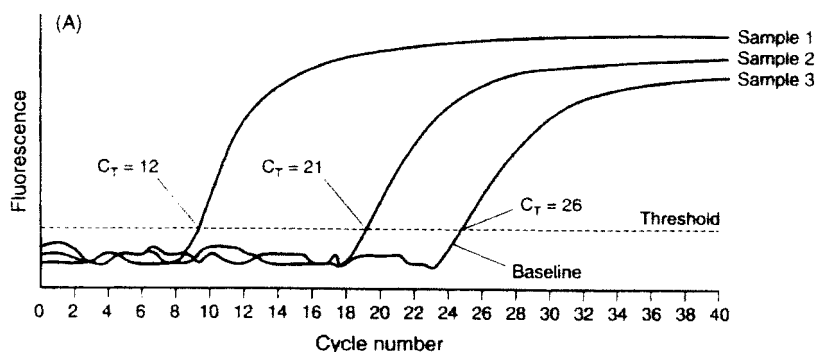
**Tabelle 3.3** TaqMan® PCR-Ansatz

Schritt	Aktivierung		PCR (45 Zyklen)	
	AmpEraseUNG	AmpliTaQGold	Denaturierung	Annealing/ Extension
<b>Zeit</b>	2min	10min	15 sec	1 min
<b>Temperatur</b>	50°C	95°C	95°C	60°C

**Tabelle 3.4** PCR-Protokoll für den ABI Prism 7900 HAT

### 3.2.3.2 Auswertung

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mit der relativen Standardkurvenmethode. Hierbei wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen (50, 25, 12,5, 6,25, 0 ng/ $\mu$ l) hergestellt, über die dann dem  $C_T$ -Wert der unbekannten Probe eine Konzentration zugeordnet werden kann. Der  $C_T$  (threshold cycle) gibt die Nummer des Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal der PCR eine festgelegte Schwelle überschreitet. Je höher die eingesetzte DNA-Menge ist, desto früher wird dieser Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der  $C_T$ -Wert (Abb.3.2). Als endogene Kontrolle diente in diesem Ansatz die 18S rRNA, ein sog. Housekeeping Gen, das in allen Zellen etwa in gleichem Maße konstitutiv exprimiert sein soll und somit als Maß für die eingesetzte RNA Gesamtmenge verwendet werden kann. Alle Expressionswerte wurden auf die 18S rRNA Expression der jeweiligen Probe normiert. Im letzten Schritt sollten die COX 2 und PPAR $\gamma$  Expressionswerte der untersuchten Zellen miteinander verglichen werden. Dazu wurde der jeweils geringste Expressionswert als Kalibrator verwendet und die übrigen Expressionswerte als ein Vielfaches dieses Wertes angegeben (FC-Wert).



**Abbildung 3.2** Schematische Darstellung einer typischen real time PCR Reaktion. Das Fluoreszenzsignal ist gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Der  $C_T$  Wert entspricht der Nummer des Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal eine bestimmte Schwelle (threshold) überschreitet. Je höher die DNA Menge, desto niedriger ist der  $C_T$  Wert. Aus PCR, Michael McPherson, Simon Möller, PCR, 2. Auflage

### **3.3 Messung der Zellproliferation**

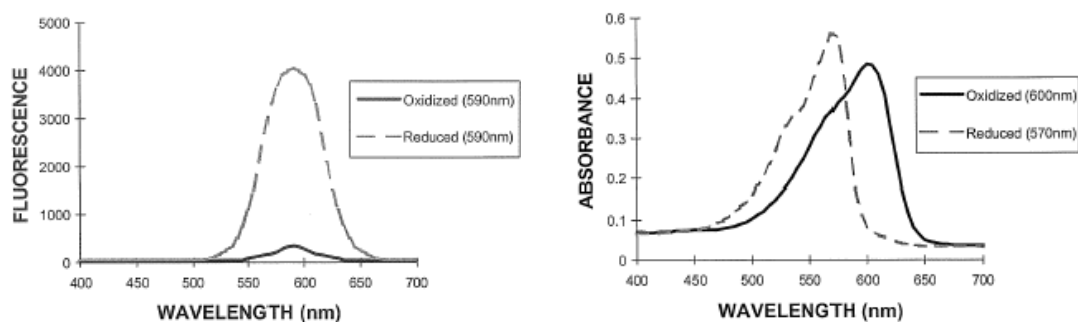
In diesem Teil der Arbeit sollte der Einfluss der Testsubstanzen auf das Zellwachstum untersucht werden. Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit Hilfe des Cell proliferation Elisa BrdU und des alamarBlue<sup>TM</sup> Assays. Um einen direkten Vergleich der Testergebnisse zu ermöglichen, wurde für beide Testverfahren ein identischer Versuchsaufbau gewählt.

Melanom- und Angiosarkomzellen wurden in zellkulturbeschichteten Multititer-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen für 48h mit verschiedenen Konzentrationen von Rapamycin, Celecoxib, Pioglitazon, Kombinationen der Medikamente und den jeweiligen Negativkontrollen behandelt. Zelldichte, Inkubationszeit und Medikamentenkonzentrationen wurden in Vorversuchen festgelegt. Für alamarBlue<sup>TM</sup> Versuche wurden je eine Testplatte mit Zellen und eine Leerwert-Kontrolle ohne Zellen verwendet. Beim BrdU Test konnte auf die Leerwert-Kontrollplatte verzichtet werden, da in diesem Versuch die Testsubstanzen vor der Messung entfernt und die Zellen mehrfach gewaschen wurden. Die alamarBlue<sup>TM</sup> Versuche wurden in 24-Well Platten durchgeführt, dabei wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen für jede Medikamentenkonzentration 4-fach bestimmt. Bei den BrdU-Tests wurden für jede Konzentration 6-fach-Bestimmungen in 96-Well Platten durchgeführt. Jeder Versuch wurde mindestens zweimal wiederholt. Die Absorptionsmessung erfolgte am Mithras LB 940 (Berthold technologies). Alle Auswertungen wurden mit Microsoft Excel erstellt, aus mehreren unabhängigen Versuchen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und die Ergebnisse in Diagrammen zusammengefasst. Zellwachstum und Stoffwechselaktivität wurden als prozentualer Anteil im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle angegeben.

### 3.3.1 alamarBlue™ Assay (Biosource)

#### 3.3.1.1 Testprinzip

Der alamarBlue™ Assay beinhaltet einen Redox-Indikator, der zur quantitativen Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen verwendet werden kann. Die Reduktion des Indikators führt sowohl zu einem Farbumschlag von blau nach rot als auch zu einer Veränderung des Fluoreszenzsignales, wobei die oxidierte Form gering und die reduzierte Form stark fluoresziert (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3** Fluoreszenz und Absorptionsspektrum des alamarBlue™ Farbstoffes. Quelle: Technical Bulletin alamarBlue™ Assay, Biosource

Die Redox-Reaktion, die in den Mitochondrien der Zellen abläuft, basiert auf folgendem Mechanismus: Im letzten Schritt der Atmungskette überträgt die Cytochrom c Oxidase zwei Elektronen auf Sauerstoff und reduziert diesen dadurch zu Wasser. Da das Redoxpotential des alamarBlue™ Farbstoffes zwischen dem von Cytochrom c und Sauerstoff liegt, dient der Indikator als artifizieller Elektronenakzeptor und unterbricht so die Atmungskette. Diese Reaktion läuft nur innerhalb der Zelle in den Mitochondrien ab, daher ist die Reduktion des alamarBlue™ Farbstoffes und damit auch die Stärke des Farbumschlags bzw. des Fluoreszenzsignales ein direktes Maß für die Stoffwechselaktivität der Zelle.

Da die verwendeten Testsubstanz Rapamycin eine starke Autofluoreszenz aufweist, lieferte die Fluoreszenzmessung keine verwertbaren Ergebnisse. Alternativ wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 540nm und 600nm bestimmt. Bei dieser Bestimmungsmethode wird das Signal des Leerwertes (Absorption der Testsubstanz mit alamarBlue™) bei der Berechnung des Ergebnisses mit berücksichtigt, was bei der Fluoreszenzmessung nicht der Fall ist.

### 3.3.1.2 Versuchsprotokoll

1. Zellen abtrypsinieren, zentrifugieren und in FKS-haltigem RPMI Medium re-suspendieren
2. Zellen in Neubauer-Kammer auszählen und mit einer Multipipette  $1,2 \times 10^4$  (A375) bzw.  $1,5 \times 10^4$  (ASM, IGR1, Iso Has, Mel Ho) Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte geben (Zielvolumen 500-800µl), Zellen durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilen und über Nacht im Brutschrank inkubieren
3. Medikamentenverdünnungen frisch herstellen und vor Gebrauch gut mischen
4. Kulturmedium aus 24-Well-Platte absaugen und durch 900µl der jeweiligen Test-/ Kontrollsubstanz ersetzen
5. 100µM alamarBlue™ Farbstoff in jedes Well geben und den Farbstoff durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilen
6. Platte für weitere 48h im Brutschrank inkubieren
7. 24h und 48h nach Zugabe der Medikamente und des alamarBlue™ Farbstoffes Absorptionsmessung bei 540 und 600nm am Mithras LB 940

### 3.3.1.3 Auswertung

Der Anteil des reduzierten alamarBlue™ wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet.

$$\% \text{ reduziertes alamarBlue} = \frac{(\epsilon_{\text{ox}600\text{nm}})(A_{540\text{nm}}) - (\epsilon_{\text{ox}540\text{nm}})(A_{600\text{nm}})}{(\epsilon_{\text{red}540\text{nm}})(A_{600\text{nm}}^*) - (\epsilon_{\text{red}600\text{nm}})(A_{540\text{nm}}^*)} \cdot 100$$

wobei gilt:

$\epsilon_{\text{ox/red}}$  = molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten/ reduzierten alamarBlue™ bei der jeweiligen Wellenlänge mit:

$$\epsilon_{\text{ox}540} = 47,619$$

$$\epsilon_{\text{ox}600} = 117,216$$

$$\epsilon_{\text{red}540} = 104,395$$

$$\epsilon_{\text{red}600} = 14,652$$

$A_{540/600\text{nm}}$  = Absorption im Testwell bei 540/ 600nm

$A_{540/600\text{nm}}^*$  = Absorption des Leerwertes bei 540/ 600nm

Zur quantitativen Bestimmung der Wachstumsinhibition wurden die berechneten Werte der Negativkontrollen und der behandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Wachstum in \%} = \frac{\text{Reduziertes alamarBlue}^{\text{TM}} (\text{Testsubstanz})}{\text{Reduziertes alamarBlue}^{\text{TM}} (\text{Negativkontrolle})}$$

### **3.3.2 Cell Proliferation ELISA BrdU (Roche Applied Science)**

#### **3.3.2.1 Testprinzip**

Da der alamarBlue<sup>TM</sup> Assay in erster Linie ein Testverfahren für die metabolische Aktivität der Zellen darstellt, sollten die beobachteten wachstumshemmenden Effekte von Rapamycin und Celecoxib nochmals auf DNA-Ebene bestätigt werden. Hierzu wurde der colorimetrische Immunoassay Cell proliferation ELISA BrdU verwendet, der durch Messung der BrdU Inkorporation in die DNA eine Quantifizierung der Proliferationsrate erlaubt. Proliferierende Zellen bauen das Pyrimidin-Analogon BrdU an Stelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA ein. Durch Fixieren der Zellen und Denaturieren der DNA wird eine Markierung mit spezifischen BrdU Antikörpern erleichtert. Die so entstandenen BrdU-Anti-BrdU-POD Immunkomplexe werden anschließend durch eine spezifische Substratreaktion detektiert. Durch Absorptionsmessung bei 405 und 490nm am Mithras LB 940 wird das Ausmaß dieser Reaktion bestimmt. Hierbei korrelieren die Absorptionswerte direkt mit der neu synthetisierten DNA-Menge und so auch mit der Proliferationsrate der Zellen.

#### **3.3.2.2 Versuchsprotokoll**

1. Zellen abtrypsinieren, zentrifugieren und in FKS-haltigem Kulturmedium re-suspendieren
2. Zellen in Neubauer-Kammer auszählen und mit einer Multipipette  $2,5 \times 10^3$  (A375, IGR und Isos1) bzw.  $3 \times 10^3$  (Mel Ho, Iso Has, ASM) Zellen pro Well in eine zellkulturbeschichtete 96-Well-Platte geben (Zielvolumen 100µl), Zellen durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilen und über Nacht im Brutschrank inkubieren
3. Medikamentenverdünnungen frisch herstellen und vor Gebrauch gut mischen
4. Kulturmedium aus 96-Well-Platte vorsichtig ausklopfen, durch 100µl der jeweiligen Test- bzw. Kontrollsubstanzen ersetzen und Platte für weitere 48h bei 37°C im Brutschrank inkubieren
5. Nach 32h 10µl BrdU labeling solution (10µM) in jedes Well geben und Zellen für weitere 16h bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
6. nach einer Gesamtinkubationszeit von 48h Medium entfernen, 200µl Fix/Denat in jedes Well geben und Platten für 30min bei Raumtemperatur inkubieren
7. Fixierungslösung durch Ausklopfen entfernen



8. 100µl anti-BrdU working solution zugeben und Platten für 90min bei Raumtemperatur inkubieren
9. Anti-BrdU-Antikörper entfernen, dazu 3x mit 200µl Waschlösung spülen und Waschlösung entfernen
10. 100µl Substrat-Lösung zugeben und Platten für 15min bei Raumtemperatur inkubieren bis genug Farbumschlag für Messung erreicht ist
11. Messung der Absorption bei 405 und 490nm am Mithras LB 940

### 3.3.2.3 Auswertung

Die BrdU-Inkorporation in die Zellen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{BrdU-Inkorporation} = (A_{405} - A_{490}) - (A_{405}^* - A_{490}^*)$$

Wobei gilt:

$A_{405/490}$  = Absorption im Testwell bei 405/ 490nm

$A_{405/490}^*$  = Absorption des Leerwertes bei 405/ 490nm

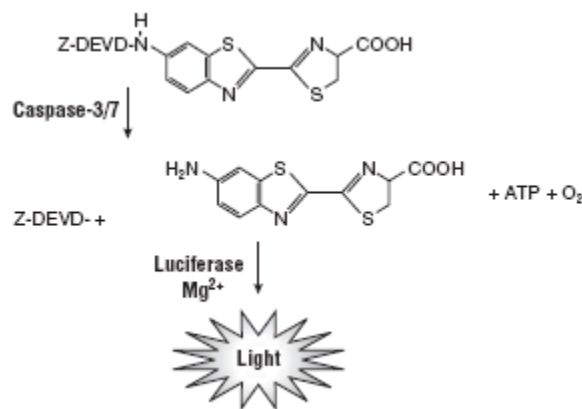
Anschließend wurden von den 6 berechneten Werten einer Medikamentenkonzentration Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und die Ergebnisse in einem Diagramm zusammengefasst. Die BrdU-Inkorporation ist ein direktes Maß für die Proliferationsrate der Zellen. Zur quantitativen Bestimmung der Wachstumsinhibition wurden die berechneten Werte der Negativkontrollen und der behandelten Zellen ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Wachstum in \%} = \frac{\text{BrdU-Inkorporation (Testsubstanz)}}{\text{BrdU-Inkorporation (Negativkontrolle)}}$$

### 3.4 Untersuchung der Apoptoserate

#### 3.4.1 Beschreibung des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay (Promega)

Mit Hilfe des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assays wird die Aktivität der Caspasen 3 und 7 bestimmt. Der Assay beinhaltet die prolumineszente Substanz Z-DEVD-Aminoluciferin, die mit ihrer DEVD-Tetrapeptidsequenz ein selektives Substrat der Caspasen 3 und 7 darstellt. Durch die Applikation des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Reagenzes kommt es zur Zelllyse und somit zur Freisetzung der Caspasen 3 und 7. Diese spalten Z-DEVD-Aminoluciferin zu Aminoluciferin, dessen Reaktion mit dem Enzym Luciferase zur Freisetzung von Licht führt. Das gemessene Lumineszenzsignal ist proportional zur Caspase-Aktivität in den Zellen.



**Abbildung 3.4** Abspaltung der Z-DEVD-Sequenz von Aminoluciferin durch Caspase 3 und 7 führt zur Freisetzung von Licht. Quelle: Technical Bulletin Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/ 7 Assay, Promega

#### 3.4.2 Versuchsaufbau

In diesem Teil der Arbeit sollten beurteilt werden, inwieweit Rapamycin und Celecoxib als Einzelsubstanz oder in Kombination die Apoptoserate von Melanom- und Angiosarkomzellen beeinflussen. Dazu wurden die Zellen für 24h mit den Testsubstanzen oder den jeweiligen Negativkontrollen (Kulturmedium oder mit Kulturmedium verdünntes DMSO) inkubiert.

Im Rahmen der Wachstumsversuche konnte gezeigt werden, dass beide Medikamente hemmende Einflüsse auf die Zellproliferation besitzen. Um für die Bestimmung der Apoptoserate vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit den Testsubstanzen behandelt und erst zur eigentlichen Messung der Lumineszenzsignale in 96-Well-Platten übertragen. Um sicherzustellen, dass das gemessene Lumineszenzsignal nur aus dem jeweiligen Testwell stammt und die Mess-

werte nicht durch die Lumineszenz der benachbarten Wells beeinträchtigt werden, wurden für diesen Versuch weiße 96-Well Platten verwendet. Da auch in FKS-haltigem Kulturmedium Caspase 3- und 7-Aktivität nachgewiesen werden kann, wurden die behandelten Zellen in FKS-freiem Kulturmedium resuspendiert, um Verfälschungen der Testergebnisse zu vermeiden. Als Leerwert diente FKS-freies Medium mit Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Reagenz. Für jedes Medikament wurde die Caspase-Aktivität 8-fach bestimmt, jedes Einzelexperiment wurde mindestens zweimal wiederholt.

### **3.4.3 Versuchssprotokoll**

1. Zellen aus einer T<sub>75</sub> Zellkulturflasche (mit zu 80 % konfluenten Zellen) auf 5 Flaschen verteilen und über Nacht anwachsen lassen (für Melanomzellen 10<sup>6</sup> Zellen in T<sub>75</sub> für Angiosarkomzellen 5x10<sup>5</sup> Zellen in T<sub>25</sub> Zellkulturflaschen)
2. Kulturmedium absaugen und durch Medikamente ersetzen (10ml/ 5ml pro Flasche)
3. nach 24h Zellen abschaben, mit 5ml Medium abspülen, in 50ml-Röhrchen geben und 5min bei 1200rpm zentrifugieren
4. Überstand absaugen und Zellpellet in FKS-freiem Medium (Raumtemperatur) resuspendieren
5. Zellen in einer Neubauer-Kammer auszählen und mit einer Multipipette 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in eine weiße 96 Well Platte geben (Zielvolumen 100µl, je 8 Wells pro Flasche)
6. 100µl FKS-freies Medium zur Leerwertbestimmung in 8 Wells geben
7. Beide Reagenzien des Caspase-Glo<sup>™</sup> 3/7 Assays auf Raumtemperatur equilibrieren und vermischen, 100µl Caspase-Glo<sup>™</sup> 3/7 Assay in jedes Well geben
8. Platte mit Parafilm bedecken und 30s bei 500rpm am Schüttler mischen
9. Platte für 1h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubieren (Zeit wurde in einem Vorversuch festgelegt)
10. Lumineszenzmessung am Mithras LB 940

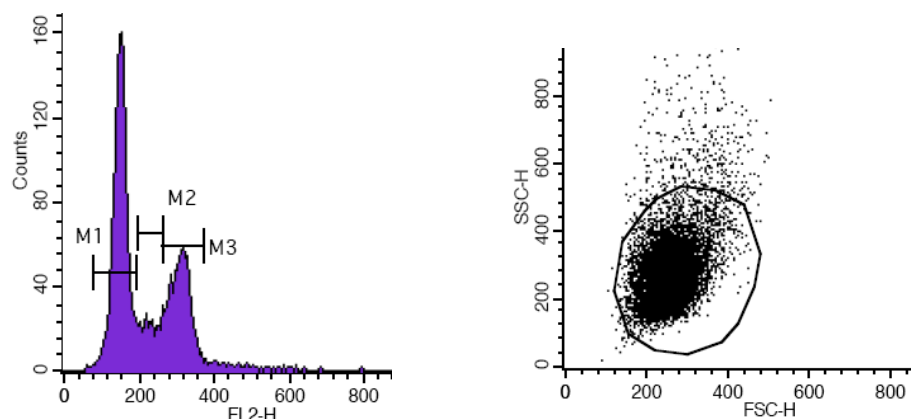
### **3.4.4 Auswertung**

Die am Mithras LB 940 gemessenen Lumineszenzwerte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet. Von jedem Messwert wurde der Leerwert abgezogen und danach Mittelwert und Standardabweichung der 8 berechneten Werte gebildet. Die Ergebnisse wurden in einem Diagramm zusammengefasst. Die Stärke des Lumineszenzsignals ist direkt proportional zur Aktivität der Caspase 3 und 7.

### 3.5 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

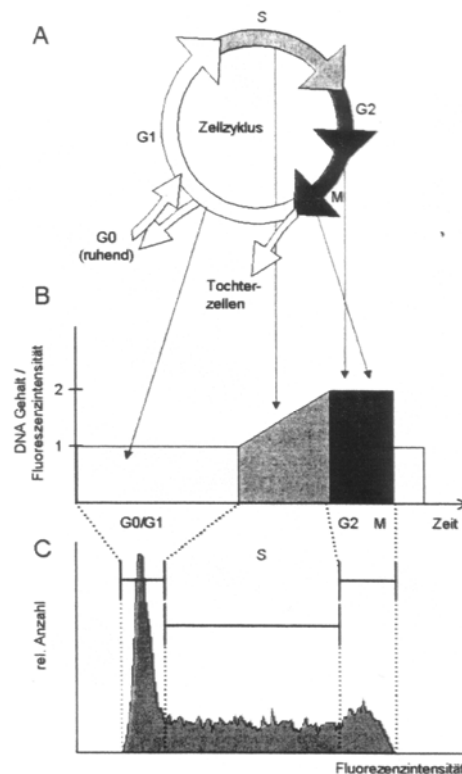
#### 3.5.1 Testprinzip (21)

Die Durchflusszytometrie (engl. FACS fluorescence activated cell sorting) ist ein optisches Testverfahren, das die Analyse von Zellen aufgrund ihrer lichtstreuenden und fluoreszierenden Eigenschaften ermöglicht. Je nach Fragestellung können einzelne Zellen nach Größe, Dichte oder DNA-Gehalt charakterisiert werden. Die Zellsuspension wird durch eine Stahlküvette in das Meßsystem eingesaugt und von einer Trägersubstanz aufgenommen. Durch die Fokussierung der Zellen innerhalb eines coaxialen Flüssigkeitsstrahls (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung) werden die Zellen wie Perlen an einer Perlenschnur aufgereiht und passieren so nacheinander einen Laserstrahl. Je nach Eigenschaft der Zelle wird das Laserlicht gestreut. Der Grad der Streuung des Laserstrahls nach vorne korreliert mit der Zellgröße während die Streuung zur Seite von der Granularität der Zelle abhängt. Zusätzlich können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Das Laserlicht regt diese Farbstoffe an und hebt dabei ihre Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Fallen die Elektronen wieder auf eine kernnähere Schale zurück, so wird die Energie in Form von Licht abgegeben und kann als Fluoreszenzsignal detektiert werden. Mit Hilfe eines Histogramms kann die Häufigkeitsverteilung eines Signals über einer Zellpopulation eindimensional dargestellt werden, die grafische Darstellung zweier Parameter in x/y-Diagrammen ergibt so genannte „dot plots“ (Abb.3.5).



**Abbildung 3.5** Histogramm zur eindimensionalen Darstellung der Häufigkeitsverteilung eines Signals über einer Zellpopulation und dot plot zur korrelierten Darstellung zweier Signale in einem x/y-Diagramm.

In diese Arbeit sollte mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen bestimmt werden. Zur quantitativen Bestimmung des DNA-Gehalts wurden die Zellen mit Propidium-Iodid behandelt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff heftet sich zwischen die Basen der DNA-Doppelhelix und markiert so alle doppelsträngigen DNA-Abschnitte. Da Propidium Iodid die intakte Zellmembran nicht passieren kann, ist eine Fixierung der Zellen mit Ethanol nötig. Der Fluoreszenzfarbstoff kann bei 488nm durch einen Argon-Laser angeregt werden (22). Die Zellzyklusanalyse erfolgte am FACSCalibur Durchflusszytometer, die Auswertungen wurden mit CellQuest erstellt. Die detektierten Zellen wurden in einem Histogramm zusammengefasst. Abb.3.6 zeigt den DNA Gehalt der Zelle und das Verhalten des Fluoreszenzsignals während der Zellzyklusphasen  $G_0$ , S und  $G_2$ /M.



**Abbildung 3.6 Der DNA Gehalt im Verlauf des Zellzyklus**

A, Proliferierende Zellen durchlaufen die Zellzyklusphasen  $G_1$ , S und  $G_2$ /M, ohne externen Stimulus befinden sich die Zellen in der Ruhephase  $G_0$   
 B, Somatische, nicht transformierte Zellen weisen in der  $G_1$ -Phase einen diploiden ( $2n$ ) DNA-Gehalt auf. In der DNA-Synthesephase (S-Phase) wird der DNA-Gehalt vermehrt, bis das Genom in der  $G_2$ -Phase verdoppelt ist ( $4n$ ). In der Mitosephase wird der duplizierte Chromosomensatz auf zwei Tochterzellen verteilt, die wiederum einen DNA-Gehalt von  $2n$  aufweisen. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zum DNA-Gehalt im Verlauf des Zellzyklus.  
 C, Im DNA-Histogramm kann die Fluoreszenzintensität den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden.  
 Aus Brockhoff: DNA und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie, in: Zelluläre Diagnostik, Hrsg. Rothe et al., 2007

### 3.5.2 *Versuchsprotokoll*

1. Zellen aus einer T<sub>75</sub> Zellkulturflasche (mit zu 80% konfluenten Zellen) auf 5 Flaschen verteilen und über Nacht anwachsen lassen ( $10^6$  Zellen pro Flasche)
2. Medium absaugen und durch 10ml Testsubstanzen ersetzen
3. Zellen für 24h mit Test/ Kontrollsubstanzen inkubieren
4. Zellen abtrypsinieren, zentrifugieren, Pellet in kaltem PBS/5mM EDTA resuspendieren
5. Zellen zählen,  $10^6$  Zellen in ein 2ml Eppendorf Cup geben und für 5min bei 3000rpm zentrifugieren
6. Pellet in kaltem PBS/5mM EDTA waschen und abzentrifugieren
7. Pellet in 1ml PBS/5mM EDTA resuspendieren, 1ml Ethanol tropfenweise hinzufügen und gelegentlich mischen, 30min bei Raumtemperatur inkubieren
8. Abzentrifugieren, Pellet in 500µl PBS/5mM EDTA resuspendieren
9. 20µl RNase A hinzugeben, mischen und für 30min bei Raumtemperatur inkubieren
10. Propidium-Iodid (100µg/ml) hinzugeben, vortexen, in FACS- Röhrchen umfüllen
11. Messung am FACSCalibur im Linear Modus, pro Messung werden  $10^4$  Zellen analysiert

### 3.6 Angiogenese-Assays

Die Bildung neuer Blutgefäße ist ein vielschichtiger Prozess, in den Migration, Proliferation, Adhäsion und Zelldifferenzierung involviert sind. Endothelzellen zeigen auch *in vitro* die Tendenz, sich zu kapillarähnlichen Strukturen zusammenzufügen. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Testverfahren verwendet um die Wirkung von Rapamycin und Celecoxib auf die Neubildung von Blutgefäßen zu untersuchen.

#### 3.6.1 *Ex vivo rat aortic ring assay*

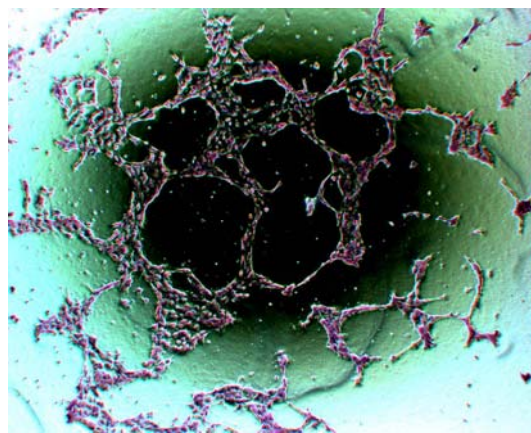
Eine weit verbreitet Methode zur Untersuchung der Angiogenese ist der *ex vivo* rat aortic ring assay. Hierbei wird eine Rattenaorta in 1mm dicke Ringe geschnitten, die anschließend in mit Matrigel<sup>TM</sup> beschichteten 24-Well Platten kultiviert werden. Nach einigen Tagen können Aussprossungen aus den Aortenringen beobachtet werden. Bei dieser Testmethode wird berücksichtigt, dass die Bildung neuer Blutgefäße nicht nur von den Endothelzellen ausgeht, sondern auch umgebende Zellen eine wichtige Rolle spielen (23). In dieser Arbeit wurde die von Nicosia (24) beschriebene Technik in modifizierter Form angewandt. Die Rattenaorten wurden freundlicherweise von der Abteilung für experimentelle Chirurgie und dem Institut für Pharmazie zur Verfügung gestellt.

#### Versuchsprotokoll

1. Aorta mehrfach mit eiskaltem PBS waschen um Blutkoagel zu entfernen, anschließend in einkaltes DMEM Medium geben und auf Eis stellen
2. Unter einem Operationsmikroskop Binde- und Fettgewebe abpräparieren und die Aorta in 1mm dicke Ringe schneiden, dabei alle Ringe mit Gefäßabgängen verwerfen
3. Matrigel<sup>TM</sup> auf Eis auftauen lassen, 200µl Matrigel<sup>TM</sup> und sofort danach 1 Aortenring in jedes Well geben. Da Matrigel<sup>TM</sup> bei Raumtemperatur schnell aushärtet müssen Pipettenspitzen und 24-Well Platte vorgekühlt und das Matrigel<sup>TM</sup> zügig verarbeitet werden
4. Platte für 30min im Brutschrank inkubieren, um Matrigel<sup>TM</sup> aushärten zu lassen
5. Medikamentenverdünnungen in DMEM Medium herstellen und vorsichtig 1ml Test- bzw. Kontrollsubstanz in die Wells geben
6. Platte im Brutschrank inkubieren, Mediumwechsel nach 3 Tagen
7. ab dem 3. Tag Fotografieren der Ringe bei 2,5x und 10x Vergrößerung

### 3.6.2 Tubular formation assay

Endothelzellen zeigen *in vitro* die Tendenz, spontan gefäßähnliche Strukturen auszubilden, wenn sie auf einer geeigneten extrazellulären Matrix kultiviert werden (Abb. 3.7) (23). In dieser Arbeit wurde als Unterlage Matrigel™ Basement Membrane Matrix verwendet, eine lösliche Extrazellulärmatrix, die aus Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkomzellen isoliert wurde. Neben seinem Hauptbestandteil Laminin beinhaltet Matrigel™ zahlreiche Wachstumsfaktoren wie TGFβ und fibroblast growth factor (25). HUVEC-Zellen wurden in mit Matrigel™ beschichteten 24Well Platten ausgesät, nach 24h wurde die Formation gefäßähnlicher Strukturen beurteilt. Um eine Veränderung in der Zellmorphologie während der bei Raumtemperatur durchgeführten Auswertung zu vermeiden, wurden die Zellen nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Paraformaldehyd fixiert und zur besseren Darstellung mit Hämalaun-Eosin angefärbt.



**Abbildung 3.7** Bildung gefäßähnlicher Strukturen im tubular formation assay

#### 3.6.2.1 Versuchsprotokoll

1. Zur Rehydratation und Entfernung von Salzurückständen 500µl warmes FKS freies Medium in jedes Well der Matrigel™ beschichteten 24 Well-Platte geben  
⇒ für 30min bei 37°C im Brutschrank inkubieren  
⇒ Medium absaugen
2. HUVEC Zellen abtrypsinieren, abzentrifugieren, in FKS freiem Kulturmedium resuspendieren und auszählen  
⇒  $9 \times 10^4$  Zellen in 500µl Medium in jedes Well geben  
⇒ Zellen durch Schwenken der Platte gleichmäßig verteilen und Platten für 2h im Brutschrank inkubieren, um die Zellen anwachsen zu lassen.
3. Testsubstanzen und Negativkontrollen in FKS freiem Kulturmedium ansetzen



- ⇒ nach 2h 500µl Test/ Kontrollsubstanzen in jedes Well geben
- ⇒ für weitere 22h inkubieren
- 4. Zum Fixieren der Zellen Medium vorsichtig absaugen und 500µl Paraformaldehyd (2%) in jedes Well geben
  - ⇒ 20min bei Raumtemperatur inkubieren
- 5. Paraformaldehyd vorsichtig absaugen und jedes Well mit 500µl PBS spülen
  - ⇒ Platte unter dem Abzug trockene lassen
  - ⇒ Lagerung der Platte bei 4°C

### 3.6.2.2 Färben der Zellen

1. 400µl Hämalun nach Mayer für 8min
2. Spülen mit 1ml Aqua dest
3. Bläuen in 1ml warmen Wasser für 5min
4. Spülen mit 1ml Aqua dest.
5. Gegenfärben mit 300µl Eosin 0,1% für 5min
6. Spülen mit Aqua dest.
7. Trocknen

### 3.6.2.3 Auswertung

Zur semiquantitativen Auswertung wurden die Gefäßformationen in Kategorien von 0 - 3 eingeteilt. Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung der Zellen innerhalb des Wells wurden die Strukturen in der Mitte und am Rand des Wells jeweils getrennt voneinander beurteilt. Für jede Bedingung wurden je 4 Wells in 2 unterschiedlichen Platten beurteilt und der Mittelwert berechnet. Tabelle 3.5 fasst die Kriterien zur Einteilung zusammen.

Kategorie	Mitte	Rand
<b>0</b>	Keine Tubuli sichtbar, tote Zellen	Nicht an allen Stellen Zellen sichtbar
<b>1</b>	Einzelne längliche Zellen, Tendenz zur Gefäßformation erkennbar	Im gesamten Randbereich Zellen sichtbar, vereinzelt Tubuli erkennbar
<b>2</b>	Viele Tubuli, Zellhaufen und plumpe Zellen, Gefäße durch viele Zellen begrenzt	Zellen im gesamten Randbereich, mehr Tubuli
<b>3</b>	Viel dünne schlanke Tubuli, Begrenzung durch einzelne Zellen	Sehr viele Tubuli im gesamten Randbereich

**Tabelle 3.5** Einteilungskriterien für die semiquantitative Auswertung des tubular formation assays.

### **3.7 Statistik**

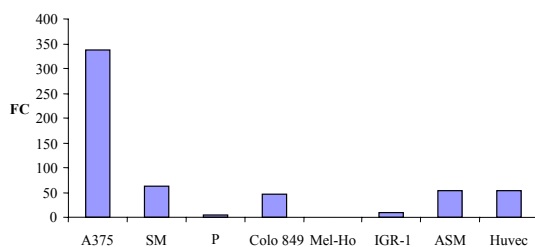
Alle Auswertungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel erstellt. Aus den Ergebnissen mehrerer unabhängiger Versuche wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und die Daten in Diagramme zusammengefasst. Die statistische Analyse erfolgte mit SPSS Version 12.0. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Während die Apoptose und Zellzyklusdaten jeweils direkt miteinander verglichen wurden, wurden bei der Bestimmung der Zellproliferation die Werte der Negativkontrollen und der behandelten Zellen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Hierbei betrug das Wachstum der unbehandelten Kontrolle 100%. Aus diesem Grund wurden die Signifikanzniveaus für die Wachstumsversuche einseitig, für Zellzyklusanalyse und Apoptose zweiseitig bestimmt. Ein Unterschied zwischen Ergebnissen von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant bezeichnet.

## 4 ERGEBNISSE

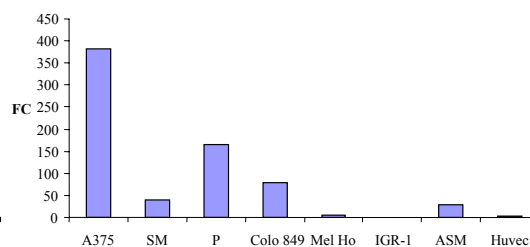
### 4.1 COX 2 und PPAR $\gamma$ mRNA Expressionsanalyse

Im ersten Teil der Arbeit wurden acht humanen Zelllinien durch quantitative real time RT-PCR auf ihr COX 2 und PPAR $\gamma$  mRNA Expressionsmuster untersucht. Alle Zelllinien waren positiv für COX 2 und PPAR $\gamma$  mRNA, wobei die Höhe der Expression zwischen den einzelnen Zelllinien stark variierte. A375 Melanomzellen zeigten das höchste COX 2 mRNA Expressionlevel, gefolgt von HUVEC, ASM, Colo849 und A375 SM Zellen. In IGR 1, A375 P und Mel Ho Zellen war die COX 2 Expression sehr gering (Abb. 4.1). Auch die höchste PPAR $\gamma$  Expression konnte in A375 Zellen nachgewiesen werden, gefolgt von A375 P, Colo 849, A375 SM und ASM. Mel Ho, HUVEC und IGR 1 Melanomzellen enthielten nur wenig PPAR $\gamma$  mRNA (Abb.4.2)

Um zu bestimmen, ob die Wirkung von COX 2 Hemmern und PPAR $\gamma$  Agonisten von der COX 2 und PPAR $\gamma$  Expression abhängig ist, wurden die Melanomzelllinien A375, Mel Ho und IGR 1 für weitere Analysen ausgewählt. Die COX 2 mRNA Expression war in A375 Melanomzellen 337-fach höher als in Mel Ho und 37-fach höher als in IGR 1 Zellen, für die PPAR $\gamma$  Expression betrug der Faktor 63 für Mel Ho und 381 für IGR 1.



**Abbildung 4.1** COX 2 Expression in humanen Zelllinien.



**Abbildung 4.2:** PPAR $\gamma$  Expression in humanen Zelllinien

		A375	SM	P	Colo 849	Mel Ho	IGR 1	ASM	HUVEC
COX 2	CT	26,2	29,2	33,9	28,8	37,1	32,6	28,3	28,1
	FC	337,2	61,7	5,3	46,8	1,0	8,9	54,5	53,8
PPAR $\gamma$	CT	30,5	33,4	30,6	31,6	35,2	38,3	33,2	36,0
	FC	381,4	39,8	165,0	79,7	6,0	1,0	28,2	3,8

**Tabelle 4.1:** Ergebnisse der TaqMan real time RT-PCR zur Analyse der COX 2 und PPAR $\gamma$  Expression in humanen Zelllinien. Der C<sub>T</sub>-Wert gibt die Nummer des PCR-Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert überschritt. Der FC-Wert gibt die Expression im Vergleich zur Zelllinie mit der niedrigsten COX 2 bzw. PPAR $\gamma$  Expression an.

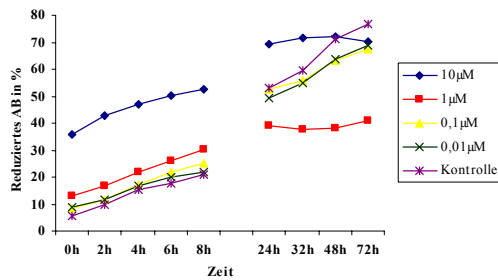
## 4.2 Melanom

### 4.2.1 Untersuchung der Zellproliferation

#### 4.2.1.1 Vorversuche

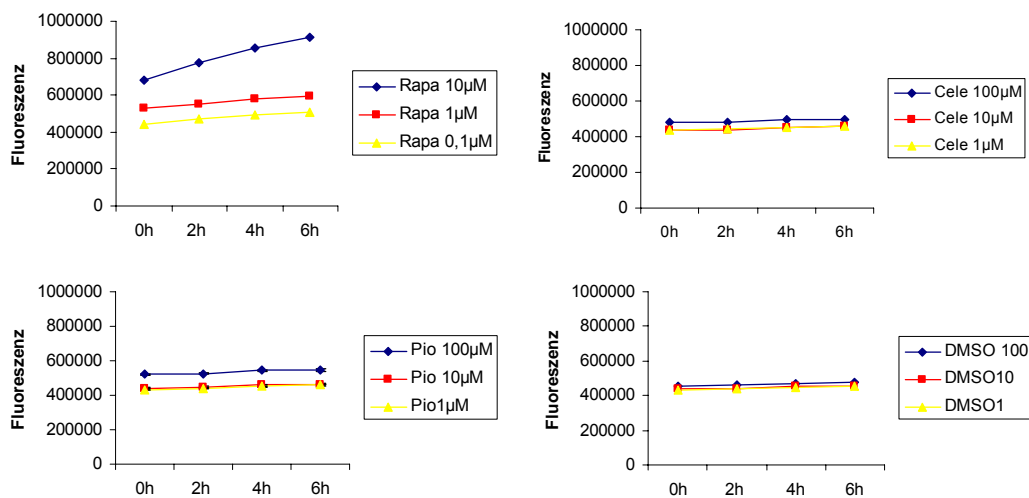
In diesem Teil der Arbeit sollte mit Hilfe des alamarBlue<sup>TM</sup> Assays und des Cell Proliferation Elisa BrdU Assays die Auswirkung von Rapamycin, Celecoxib und Pioglitazon auf Proliferation und Stoffwechselaktivität von Melanonzellen beurteilt werden. Um den Versuchsaufbau zu optimieren und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, mussten zunächst einige Vorversuche durchgeführt werden.

Melanomzellen sollten in 24- und 96-Well Platten über mehrere Tage mit den Testsubstanzen behandelt werden. Um die geeignete Zelldichte und Inkubationszeit zu bestimmen, wurden  $10^3$  bis  $2 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät und Zelldichte und Morphologie nach 24, 48 und 72 Stunden unter dem Mikroskop beurteilt. Im 24-Well Format lag die optimale Zellzahl bei  $1,2 \times 10^4$  pro Well für A375 und  $1,5 \times 10^4$  pro Well für Mel Ho und IGR 1 Melanomzellen, im 96-Well Format wurden  $2,5 \times 10^3$  und  $3 \times 10^3$  Zellen pro Well eingesetzt. Um die Vitalität der Zellen zu Versuchsbeginn sicherzustellen wurden die Zellen am Vortag ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Im nächsten Schritt sollten die Messzeitpunkte festgelegt werden. Hierfür wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert und die Veränderung des alamarBlue<sup>TM</sup> Farbstoffes in 2-stündigen Abständen erfasst. Wie in Abb. 4.3 veranschaulicht zeigte sich in den ersten 8 Stunden ein linearer Anstieg der Absorptionswerte. Aus diesem Grund boten sich 24 und 48h nach Zugabe der Medikamente als Messzeitpunkte an. Längere Messintervalle erwiesen sich als nicht sinnvoll, da aufgrund des Versuchsaufbaus ein Wechsel des Kulturmediums nicht möglich war. Zusätzlich hätte eine zu hohe Zelldichte nach längerer Inkubationszeit die Zuverlässigkeit der Versuchsergebnisse gefährdet.



**Abbildung 4.3** Vorversuch zur Bestimmung des optimalen Messzeitpunktes. ASM Angiosarkomzellen wurden mit 0,01-10 µM Rapamycin behandelt und die Reduktion des alamarBlue™ Farbstoffes in 2-stündigen Abstand gemessen.

Da die verwendete Testsubstanz Rapamycin in höheren Konzentrationen eine zeitlich variable Autofluoreszenz aufwies (Abb. 4.4), konnte die Stoffwechselaktivität der Zellen nicht über die Messung des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Alternativ wurde eine Absorptionsmessung bei 540 und 600nm durchgeführt. Bei dieser Bestimmungsmethode wird das Signal des Leerwertes bei der Berechnung des Ergebnisses mit berücksichtigt, was bei der Fluoreszenzmessung nicht der Fall ist.



**Abbildung 4.4** Bestimmung der Autofluoreszenz der Testsubstanzen Rapamycin, Celecoxib, Pioglitazon und der entsprechenden DMSO Kontrollen.

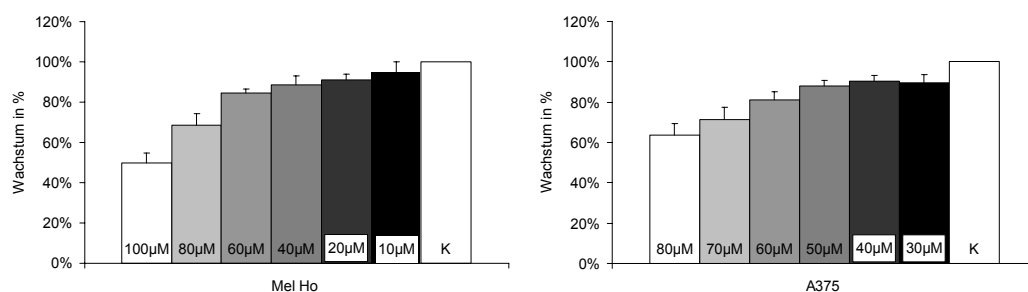
Die Zuverlässigkeit der durch den alamarBlue™ Test erhaltenen Ergebnisse sollten nochmals auf DNA-Ebene überprüft werden. Hierzu wurde der Cell Proliferation Elisa BrdU Assay ausgewählt. Dieser Test wurde im 96-Well Format durchgeführt. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu schaffen wurden die vorher bestimmte Zellzahl von  $2,5 \times 10^3$  bzw.  $3 \times 10^3$  Zellen pro Well und die Inkubationszeit mit den Testsubstanzen von 48h beibehalten. Der ideale Zeitpunkt zur Zugabe des BrdU war nach 32-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen erreicht, so dass die Zellen bis zum Versuchsende für 16h mit BrdU behandelt wurden. Nach Fixierung und Denaturierung der Zellen,

Inkubation mit einem Anti-BrdU-Antikörper und nachfolgenden Waschschritten führt die Zugabe eines Tetramethyl-Benzidin-haltigen Substrates zu einem Farbumschlag. Diese Substratreaktion sollte ursprünglich nach 15min mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt werden und anschließend die Absorption bei 450 und 690nm bestimmt werden. Da dieses Vorgehen gerade großen Probenzahlen nicht praktikabel war, wurde auf diesen letzten, im Testprotokoll als fakultative bezeichneten, Schritt verzichtet. Alternativ wurde die BrdU-Inkorporation in die DNA durch Messung der Absorption bei 405 und 490nm quantifiziert.

#### 4.2.1.2 Antiproliferative Effekte von Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon

A375 und Mel Ho Melanomzellen wurden für 48h mit Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon behandelt. Zunächst sollte für jedes Medikament der Konzentrationsbereich ermittelt werden, in dem eine Hemmung der Stoffwechselaktivität der Melanomzellen zu erwarten ist. Dazu wurden die Substanzen in Konzentrationen von 0,01 bis 100µM eingesetzt. Anschließend wurde für Celecoxib der Bereich von 1 bis 100µM und für Rapamycin von 0,05 bis 1µM näher untersucht. Pioglitazon hatte nur bei 100µM signifikante antiproliferative Effekte auf A375 Melanomzellen ( $p > 0,001$ ) (Abb. 4.9). Höhere Konzentrationen an Pioglitazon konnten nicht untersucht werden, da Pioglitazon bei 100µM kristalline Strukturen bildete, die die Absorptionsmessung und somit die Zuverlässigkeit der Ergebnisse beeinträchtigt hätten.

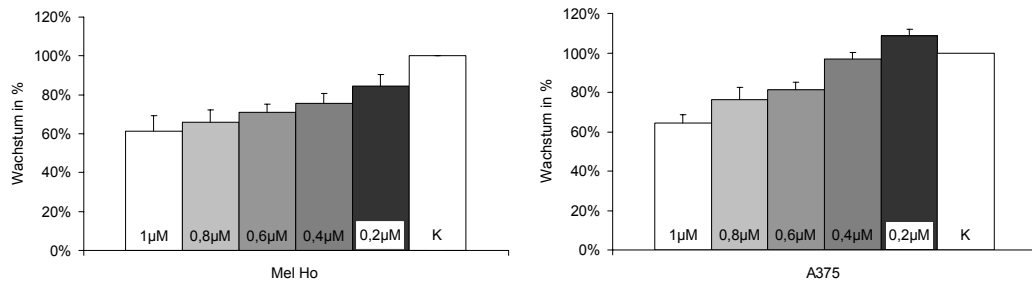
Celecoxib verursachte in beiden Zelllinien eine signifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition (Abb. 4.5). Die Behandlung mit 80µM Celecoxib reduzierte das Zellwachstum um  $31\% \pm 6\%$  in Mel Ho und  $37\% \pm 6\%$  in A375 Melanomzellen ( $p > 0,001$ ).



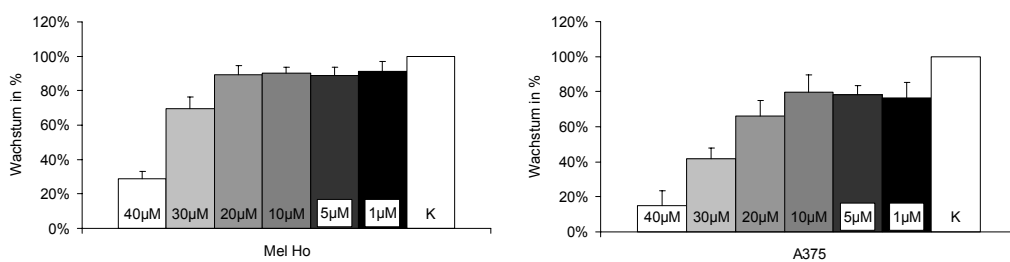
**Abbildung 4.5** Wachstumsinhibition durch Celecoxib in Mel Ho und A375 Melanomzellen (n=8).

Auch die Inkubation der Melanomzellen mit Rapamycin führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Hemmung der Zellproliferation. Während die antiproliferativen Effekte bei 1µM Rapamycin in beiden Zelllinien vergleichbar waren, (Wachstumsinhibition

36%  $\pm$  4% in A375 und 39%  $\pm$  8% in Mel Ho Zellen,  $p > 0,001$ ), waren sie in geringerer Dosierungen in Mel Ho Zellen stärker ausgeprägt als in A375 Zellen (Abb. 4.6)

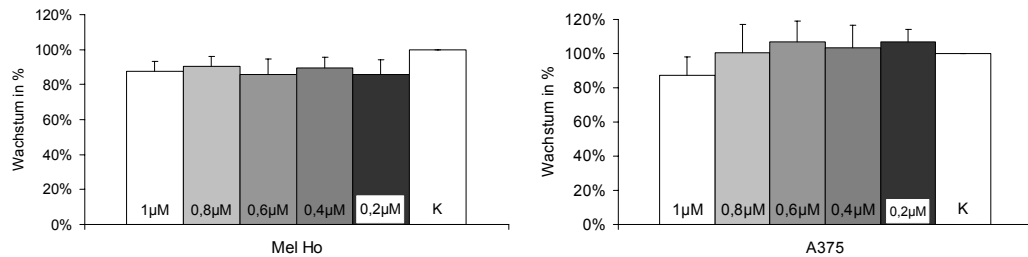


**Abbildung 4.6** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in Mel Ho und A375 Melanomzellen (n=8). Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon sind stark an Plasmaproteine gebunden (Celecoxib 97% (6), Pioglitazon 99% (9), Rapamycin 92%)(26). Um zu bestimmen, ob der Grad der Plasmaproteinbindung Einfluss auf die antiproliferative Wirkung der Medikamente hat, wurden die Wachstumsversuche zusätzlich mit serumfreiem Kulturmedium durchgeführt. Für Celecoxib konnte unter serumfreien Bedingungen schon in einem Konzentrationsbereich von 1-40µM eine signifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition beobachtet werden ( $p > 0,01$ ) (Abb. 4.7). Die Behandlung mit 30µM Celecoxib reduzierte das Zellwachstum von Mel Ho Zelle um 31%  $\pm$  7%, vergleichbare Effekte wurden unter Standardbedingungen erst bei einer Konzentration von 80µM erreicht. Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen waren die wachstumshemmenden Effekte von Celecoxib unter serumfreien Bedingungen bei A375 Zellen stärker ausgeprägt als bei Mel Ho Zellen.



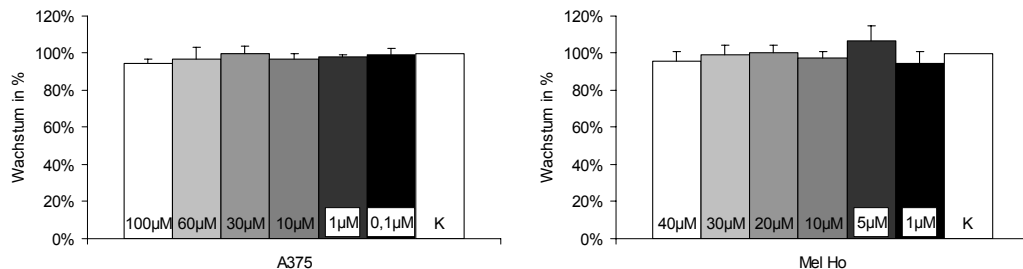
**Abbildung 4.7** Wachstumsinhibition durch Celecoxib in Mel Ho und A375 Melanomzellen unter serumfreien Bedingungen (n=8).

Die antiproliferativen Effekte von Rapamycin waren unter serumfreien Bedingungen geringer ausgeprägt als unter normalen Kulturbedingungen (Abb. 4.8). Während bei A375 Zellen nur bei 1µM Rapamycin eine Reduktion des Zellwachstums um 13%  $\pm$  11% ( $p > 0,001$ ) auftrat, betrug die Hemmung in Mel Ho Zellen bei allen Konzentrationen ca. 10% ( $p > 0,001$ ).



**Abbildung 4.8** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in Mel Ho (n=16) und A375 (n=8) Melanomzellen unter serumfreien Bedingungen.

Wie schon unter Standardbedingungen hatte die Behandlung der Melanomzellen mit Pioglitazon nur in der höchsten Konzentration Auswirkung auf die Zellproliferation ( $p > 0,01$ ) (Abb. 4.9).



**Abbildung 4.9** Wachstumsinhibition durch Pioglitazon in A375 Melanomzellen unter Standardbedingungen und in Mel Ho Melanomzellen unter serumfreien Bedingungen (n=8).

Die Bestimmung des Zellwachstums mit dem alamarBlue™ Farbstoff setzt einen linearen Zusammenhang von Stoffwechselaktivität und Zellproliferation voraus. Um sicherzustellen, dass die durch den alamarBlue™ Test gewonnenen Ergebnisse als Maß der Zellproliferation gewertet werden können, wurden die Daten mit Hilfe des Cell proliferation Elisa BrdU Assays zusätzlich auf DNA-Ebene überprüft.

Die in den alamarBlue™ Versuchen beobachtete dosisabhängige Wachstumsinhibition durch Rapamycin und Celecoxib konnte durch die Messung der BrdU-Aufnahme in die Zellen bestätigt werden. Für Rapamycin waren die antiproliferativen Effekte auf beide Zelllinien im Vergleich zu den alamarBlue™ Ergebnissen signifikant stärker ausgeprägt ( $p > 0,05$ ). Während bei der Behandlung von A375 Zellen mit  $0,4\mu\text{M}$  Rapamycin im alamarBlue™ Versuch mit einer Hemmung von nur  $3\% \pm 4\%$  ( $p = 0,05$ ) nur noch ein sehr geringer Effekt nachgewiesen werden konnte, erfasste der BrdU Test noch eine Wachstumsreduktion um  $30\% \pm 7\%$  ( $p > 0,001$ ). Für Mel Ho Zellen lag die Hemmung der Zellproliferation durch  $0,4\mu\text{M}$  Rapamycin im alamarBlue™ Test bei  $25\% \pm 5\%$  und im BrdU Test bei  $37\% \pm 7\%$  ( $p > 0,001$ ). Zusätzlich bestätigte sich im BrdU Test auch die signifikant stärkere Wirkung von Rapamycin auf Mel Ho Melanomzellen.



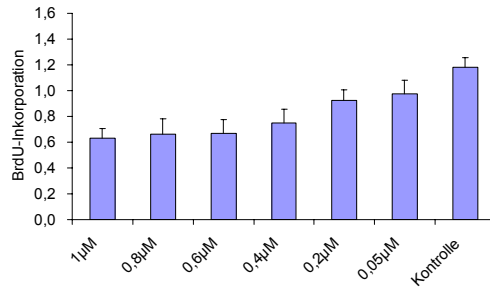
Rapamycin-Konzentration	Mel Ho		A375	
	alamarBlue™	BrdU	alamarBlue™	BrdU
<b>1µM</b>	61% ± 8%	54% ± 7%	64% ± 4%	71% ± 7%
<b>0,8µM</b>	66% ± 7%	56% ± 8%	76% ± 6%	65% ± 7%
<b>0,6µM</b>	71% ± 4%	57% ± 7%	81% ± 4%	64% ± 7%
<b>0,4µM</b>	75% ± 5%	63% ± 7%	97% ± 4%	70% ± 7%
<b>0,2µM</b>	85% ± 6%	79% ± 5%	109% ± 3%	75% ± 6%
<b>Kontrolle</b>	100%	100%	100%	100%

**Tabelle 4.2** Vergleich der Ergebnisse des alamarBlue™ und BrdU Tests für Mel Ho und A375 Melanomzellen nach 48-stündiger Behandlung mit Rapamycin. Die Zellproliferation wurde relativ zur unbehandelten Mediumkontrolle berechnet.

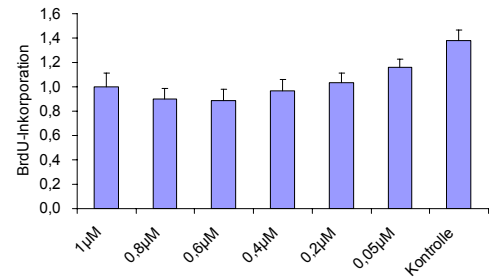
Auch die Behandlung der Mel Ho Melanomzellen mit Celecoxib lieferte für Konzentrationen ab 60µM im BrdU Test signifikant bessere Ergebnisse als im alamarBlue™ Test ( $p > 0,001$ ). Für A375 Melanomzellen waren die antiproliferativen Effekte von Celecoxib nur bei 80µM signifikant stärker als im alamarBlue™ Test ( $p > 0,01$ ). Die Abbildungen 4.10 bis 4.13 veranschaulichen die BrdU Inkorporation in die behandelten Melanomzellen.

Celecoxib-Konzentration	Mel Ho		A375	
	alamarBlue™	BrdU	alamarBlue™	BrdU
<b>80µM</b>	69% ± 6%	27% ± 4%	63% ± 6%	81% ± 14%
<b>60µM</b>	84% ± 2%	67% ± 7%	81% ± 4%	87% ± 12%
<b>40µM</b>	89% ± 3%	84% ± 10%	91% ± 3%	94% ± 8%
<b>Kontrolle</b>	100%	100%	100%	100%

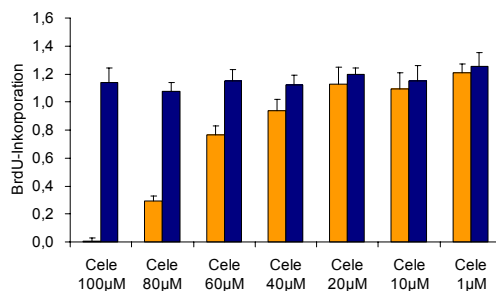
**Tabelle 4.3** Vergleich der Ergebnisse des alamarBlue™ und BrdU Tests für Mel Ho und A375 Melanomzellen nach 48-stündiger Behandlung mit Celecoxib. Die Zellproliferation wurde relativ zur DMSO Kontrolle berechnet.



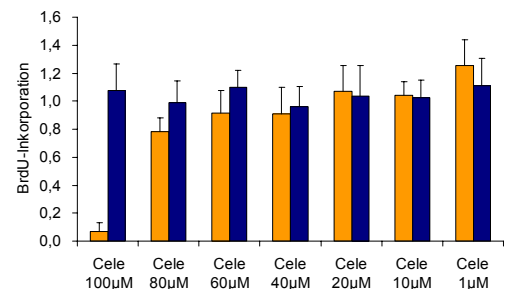
**Abbildung 4.10** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in Mel Ho Melanomzellen unter Standardbedingungen. Die BrdU-Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12)



**Abbildung 4.12** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in A375 Melanomzellen unter Standardbedingungen. Die BrdU-Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12)



**Abbildung 4.11** Wachstumsinhibition durch Celecoxib (■) und DMSO Kontrolle (■) in Mel Ho Melanomzellen unter Standardbedingungen. Die BrdU-Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12).

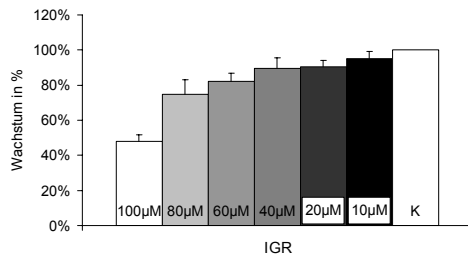


**Abbildung 4.13** Wachstumsinhibition durch Celecoxib (■) und DMSO Kontrolle (■) A375 Melanomzellen unter Standardbedingungen. Die BrdU-Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12).

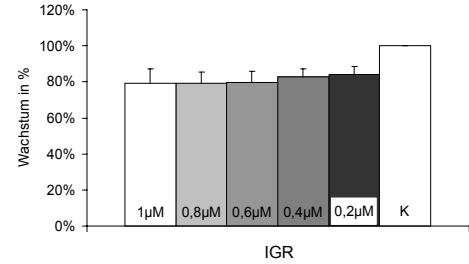
Die Effekte von Celecoxib und Rapamycin auf das Zellwachstum wurden zusätzlich für IGR 1 Melanomzellen untersucht. Auch diese Zelllinie wurde aufgrund ihrer geringen COX 2 und PPAR $\gamma$  Expression ausgewählt. Celecoxib bewirkte sowohl unter Standardbedingungen als auch unter serumfreien Bedingungen eine signifikante dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums, wobei die effektiven Konzentrationsbereiche stark voneinander abwichen, wie schon für A375 und Mel Ho Zellen gezeigt werden konnte.

Während 100µM Celecoxib unter Standardbedingungen das Zellwachstum um  $52\% \pm 4\%$  reduzierten, betrug die Hemmung  $69,7\% \pm 7\%$ , wenn 40µM Celecoxib in serumfreiem Medium gelöst wurden ( $p > 0,001$ ) (Abb.4.14 und 4.15). Die antiproliferative Wirkung von Rapamycin war im Gegensatz zu den in A375 und Mel Ho Zellen beobachteten Effekten nicht konzentrationsabhängig (Abb. 4.16). Nach 48-stündiger Inkubation betrug die Wachstumsinhibition durch 1µM Rapamycin  $21\% \pm 8\%$  und durch 0,2µM  $16\% \pm 4\%$  ( $p > 0,01$ ).

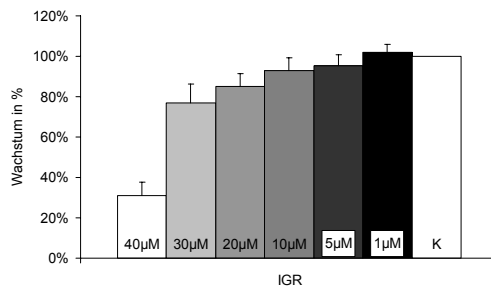
Pioglitazon hatte im Konzentrationsbereich von 10-100µM auf IGR 1 Melanomzellen keinen Effekt (Abb. 4.17).



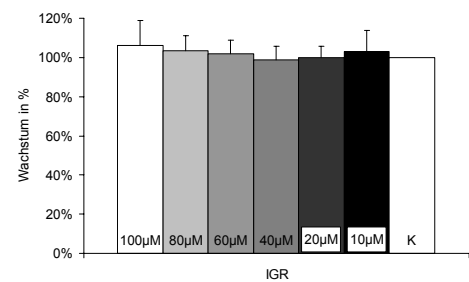
**Abbildung 4.14** Wachstumsinhibition durch Celecoxib in IGR 1 Melanomzellen unter Standardbedingungen (n=8).



**Abbildung 4.16** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in IGR 1 Melanomzellen unter Standardbedingungen (n=8).

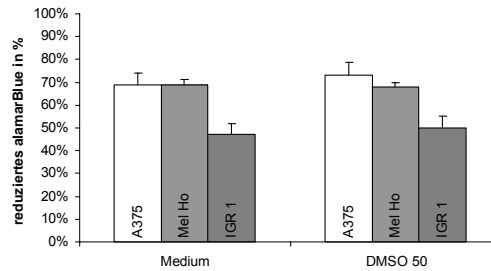


**Abbildung 4.15** Wachstumsinhibition durch Celecoxib in IGR 1 Melanomzellen unter serumfreien Bedingungen (n=8).



**Abbildung 4.17** Wachstumsinhibition durch Pioglitazon in IGR 1 Melanomzellen unter Standardbedingungen (n=8).

Diese Daten fassen die Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Versuchsreihen zusammen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass zu Versuchende im Bezug auf die Vitalität der IGR 1 Melanomzellen erhebliche Zweifel bestanden. Der in den Mitochondrien der Zellen ablaufende Umsatz des alamarBlue™ Farbstoffes ist ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen. Während der Anteil an reduziertem alamarBlue™ für die mit serumhaltigen Kulturmedium behandelten A375 und Mel Ho Zellen nach 48h  $69\% \pm 5\%$  und  $69\% \pm 2\%$  betrug, lag der Anteil bei den IGR 1 Zellen nur bei  $47\% \pm 5\%$ . Mit  $73\% \pm 6\%$  reduziertem alamarBlue™ in A375,  $68\% \pm 2\%$  in Mel Ho und  $50\% \pm 5\%$  in IGR 1 Melanomzellen zeigten sich auch in der DMSO 50 Kontrolle ähnliche Ergebnisse (Abb. 4.18). In einem zur Kontrolle durchgeführten BrdU Test konnte die antiproliferative Wirkung von Celecoxib und Rapamycin auf IGR 1 Melanomzellen nicht bestätigt. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob die beobachteten Effekte durch die verwendeten Medikamente ausgelöst wurden. Deshalb wurde im Folgenden auf weitere Versuche mit IGR Melanomzellen verzichtet.



**Abbildung 4.18** Anteil des reduzierten alamarBlue™ Farbstoffes in den Negativkontrollen in A375, Mel Ho und IGR 1 Melanomzellen. Reines Kulturmedium diente als Negativkontrolle für die Behandlung mit Rapamycin, DMSO 50 entspricht der Negativkontrolle für die Behandlung mit 50µM Celecoxib, 50µM Pioglitazon und Kombination aus 0,5µM Rapamycin und 50µM Celecoxib (n=8).

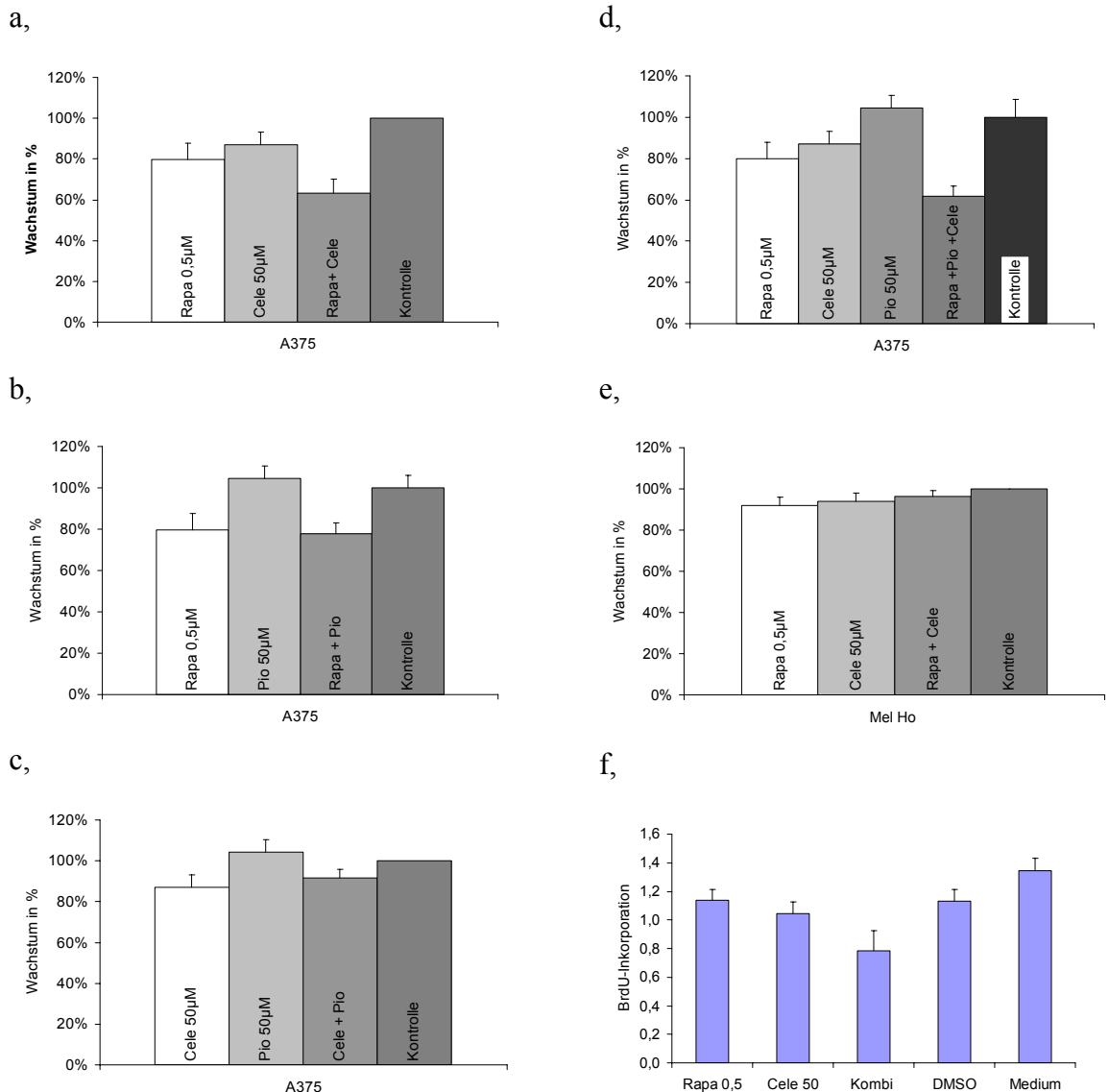
#### 4.2.1.3 Antiproliferative Effekte durch Kombinationsbehandlung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl Celecoxib als auch Rapamycin, nicht aber Pioglitazon, als Einzelsubstanzen das Wachstum von A375 und Mel Ho Melanomzellen inhibieren, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Kombination dieser Substanzen die antiproliferativen Effekte noch verstärkt. Für diesen Versuch wurden 50µM Celecoxib und Pioglitazon und 0,5µM Rapamycin eingesetzt. Als Negativkontrolle für die mit Rapamycin behandelten Zellen diente reines Kulturmedium, als Negativkontrolle für Celecoxib, Pioglitazon und die Kombinationen wurden das entsprechende Volumen an DMSO in das Kulturmedium zugegeben.

Durch die Kombination von 50µM Celecoxib mit 0,5µM Rapamycin wurden die antiproliferativen Effekte der Einzelsubstanzen in A375 Melanomzellen signifikant verstärkt ( $p = 0,002$ ). Während im alamarBlue™ Test das Wachstum durch Celecoxib um  $13\% \pm 6\%$  und durch Rapamycin um  $20\% \pm 8\%$  gehemmt wurde, betrug die Inhibition durch die Kombination beider Substanzen  $37\% \pm 7\%$  (Abb. 4.19a). Diese Verstärkung der Einzeleffekte konnte auch im BrdU Test bestätigt werden (Abb. 4.19f). 50µM Pioglitazon hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum von A375 Melanomzellen. Auch in der Kombination von Pioglitazon mit Rapamycin oder Celecoxib konnte keine signifikante Verstärkung der Einzeleffekte von Rapamycin und Celecoxib nachgewiesen werden (Abb. 4.19 b, c).

Eine Behandlung der A375 Melanomzellen mit einer Dreierkombination aus Rapamycin, Celecoxib und Pioglitazon brachte im Vergleich zur Zweierkombination aus Rapamycin und Celecoxib keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.19d). Somit konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon weder als Einzelsubstanz noch in Kombination mit Celecoxib und/oder Rapamycin das Wachstum von A375 Melanomzellen beeinflusst. Aus

diesem Grund wurde im Folgenden auf die Behandlung der Melanomzellen mit Pioglitazon verzichtet.



**Abbildung 4.19** Wachstumsinhibition durch Einzelsubstanzen und Kombination aus Rapamycin und Celecoxib (a,e,f), Rapamycin und Pioglitazon (b), Celecoxib und Pioglitazon (c) und Kombination aller Substanzen (d) in A375 (a-d,f) und Mel Ho (e) Melanomzellen. Abbildungen a-e fassen die Ergebnisse des alamarBlue™ Versuches zusammen, das Wachstum wird relativ zur unbehandelten Negativkontrolle angegeben (n=8). Die BrdU-Inkorporation (f) ist direkt proportional zur Proliferationsrate der Zellen (n=12). Medium dient als Negativkontrolle für Rapamycin, DMSO für Celecoxib, Pioglitazon und alle Kombinationen.

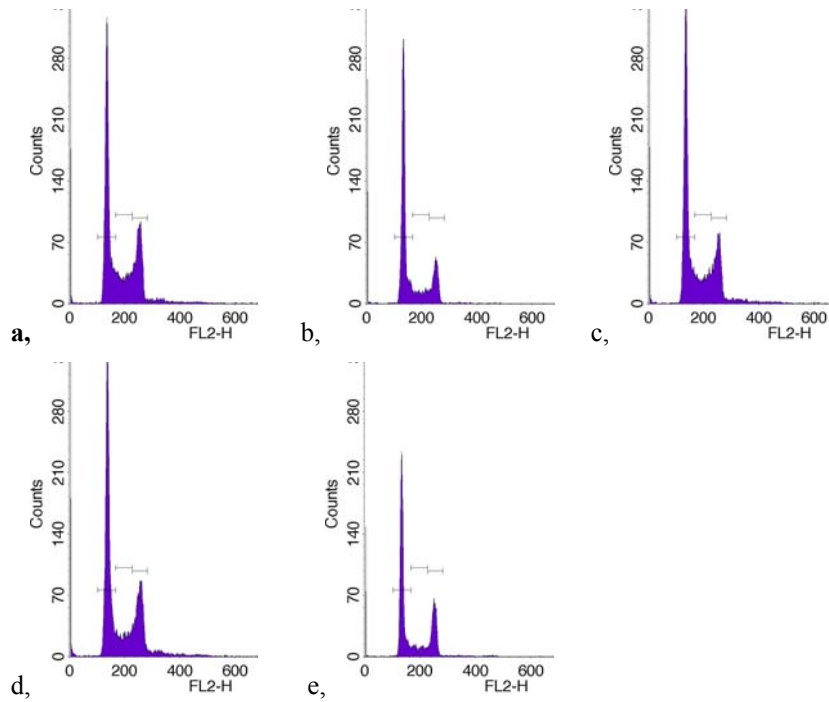
Die antiproliferativen Effekte von Celecoxib und Rapamycin auf Mel Ho Melanomzellen konnten durch eine Kombination beider Substanzen nicht signifikant gesteigert werden (Abb. 4.19 e).

#### 4.2.2 Zellzyklusanalyse

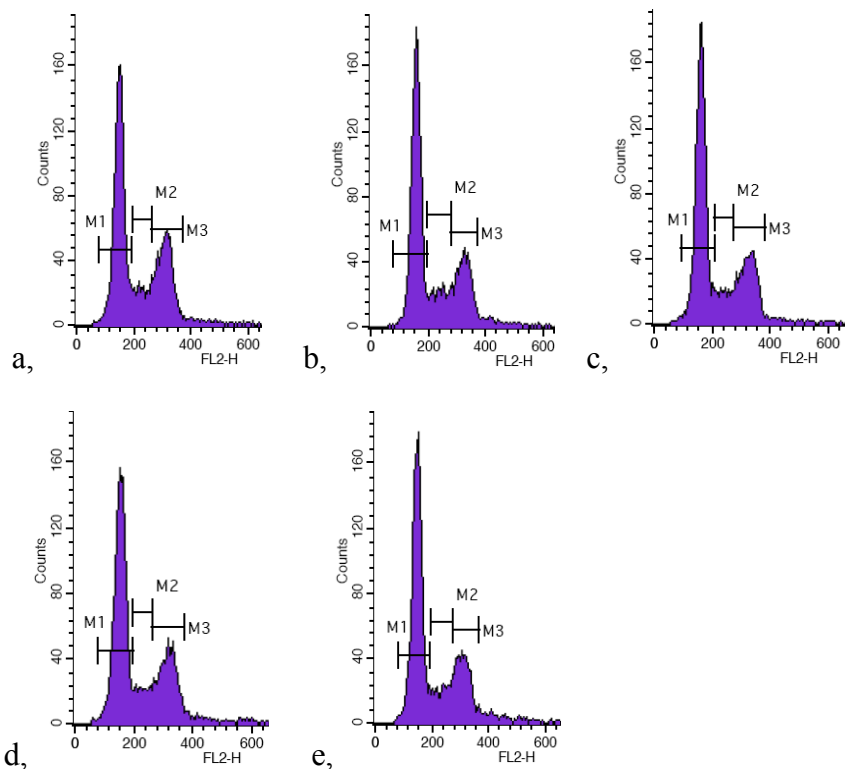
Für viele Tumorentitäten konnte gezeigt werden, dass die antiproliferativen Effekte von Celecoxib und Rapamycin durch einen Arrest in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus bedingt sind. Um zu bestimmen ob dieser Mechanismus auch in Melanomzelle eine Rolle spielt, wurden die Zellkerne mit Propidium Iodid markiert und eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5µM Rapamycin befanden sich 67,0% ± 2% der A375 Melanomzellen in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus, in der unbehandelten Kontrolle betrug der Anteil 56,5% ± 4,1%. Gleichzeitig verringerte sich der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub> Phase von 31,4% ± 1,3% auf 23,4% ± 1,9%. Für Mel Ho Zellen war der beobachtete Anstieg von 56,5% ± 3,5% auf 59,5% ± 2,1% nicht signifikant. Die Behandlung beider Zelllinien mit 50µM Celecoxib oder der Kombination aus 0,5µM Rapamycin und 50µM Celecoxib verursachte nur geringe Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst, Abb. 4.20 und 4.21 zeigen exemplarisch für jede Bedingung ein Histogramm. Wie in Kapitel 4.2.1.2 besprochen konnte bei der Behandlung von A375 Zellen mit 30µM Celecoxib unter serumfreien Bedingungen eine Inhibition des Zellwachstums um 59% ± 6% beobachtet werden. Deshalb wurden A375 Zellen mit 30µM Celecoxib und der dazugehörigen DMSO-Kontrolle behandelt und eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Da sich jedoch schon nach Inkubation mit serumfreien Kulturmedium 83,6% ± 0% der Zellen in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus befanden, konnte über die Effekte von Celecoxib und DMSO keine zuverlässige Aussage getroffen werden.

	Mel Ho			A375		
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
<b>Medium</b>	56,5 ± 3,7	15,7 ± 1,2	25,6 ± 2,6	56,5 ± 4,1	11,9 ± 3,2	31,4 ± 1,3
<b>Rapamycin 0,5µM</b>	59,5 ± 2,1	10,6 ± 0,0	24,6 ± 1,9	67,0 ± 2,0	9,6 ± 2,1	23,4 ± 1,9
<b>DMSO</b>	58,0 ± 1,1	14,6 ± 1,0	24,7 ± 0,5	61,6 ± 2,0	9,9 ± 0,0	26,5 ± 1,8
<b>Celecoxib 50µM</b>	62,9 ± 5,4	11,2 ± 0,6	22,8 ± 4,8	60,3 ± 1,9	11,2 ± 0,9	27 ± 2,1
<b>Kombination</b>	61,7 ± 3,8	11,3 ± 0,4	22,2 ± 1,6	62,1 ± 2,5	11,8 ± 1,1	22,6 ± 1,7

**Tabelle 4.4** Zellzyklusverteilung von Mel Ho und A375 Melanomzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 0,5µM Rapamycin, 50µM Celecoxib, Kombination beider Substanzen und den jeweiligen Negativkontrollen (Medium für Rapamycin und DMSO für Celecoxib und Kombination). Die Daten sind als Mittelwert (in %) ± Standardabweichung angegeben.



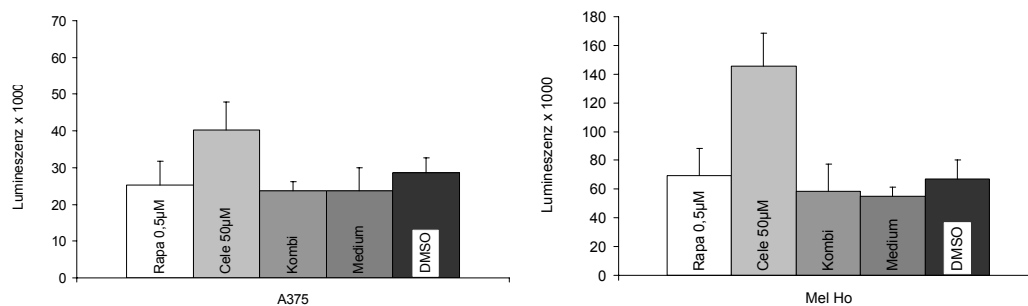
**Abbildung 4.20** Zellzyklusanalyse von Mel Ho Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Medium (a.), 0,5 $\mu$ M Rapamycin (b.), DMSO (c.), 50 $\mu$ M Celecoxib (d.) und Kombination aus 50 $\mu$ M Celecoxib und 0,5 $\mu$ M Rapamycin (e.) inkubiert.



**Abbildung 4.21** Zellzyklusanalyse von A375 Melanomzellen. Die Zellen wurden für 24 h mit Medium (a.), 0,5 $\mu$ M Rapamycin (b.), DMSO (c.), 50 $\mu$ M Celecoxib (d.) und Kombination aus 50 $\mu$ M Celecoxib und 0,5 $\mu$ M Rapamycin (e.) inkubiert. M<sub>1</sub> = G<sub>1</sub>-Phase, M<sub>2</sub> = S-Phase, M<sub>3</sub> = G<sub>2</sub>/M-Phase

### 4.2.3 Induktion der Apoptose

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der in vielen Fällen dem antitumoralen Potential von Rapamycin und Celecoxib zugrunde liegt, ist die Induktion der Apoptose. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden A375 und Mel Ho Melanomzellen für 24 Stunden mit 0,5µM Rapamycin, 50µM Celecoxib oder der Kombination aus beiden Substanzen inkubiert und anschließend die Aktivität der Caspasen 3 und 7 luminometrisch erfasst (Abb. 4.22). Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte in den mit Celecoxib behandelten Zellen ein signifikanter Anstieg der Caspase-Aktivität um den Faktor 1,4 in A375 und 2,2 in Mel Ho Melanomzellen beobachtet werden ( $p > 0,001$ ). Die geringe Veränderung der Apoptoserate durch Rapamycin um den Faktor 1,1 und 1,3 erreichte nur in Mel Ho Zellen statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ). Überraschenderweise führt die Kombination von Rapamycin und Celecoxib in beiden Zelllinien zu einer zwar geringen aber signifikanten Hemmung der Apoptose ( $p > 0,01$ ).



**Abbildung 4.22** Induktion der Apoptose in A375 und Mel Ho Melanomzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0,5µM Rapamycin, 50µM Celecoxib oder der Kombination beider Substanzen. Medium diente als Negativkontrolle für die Rapamycinbehandlung und DMSO für die Celecoxib- und Kombinationsbehandlung. Das Lumineszenzsignal korreliert direkt mit der Caspase 3 und 7 Aktivität und somit mit der Apoptoserate.



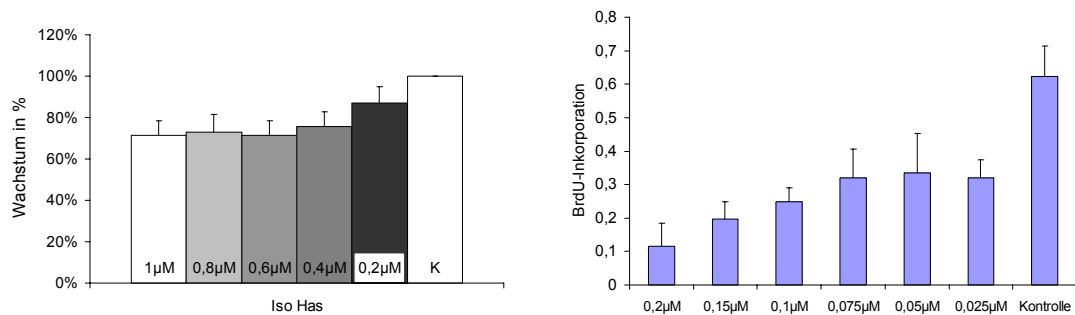
### 4.3 Angiosarkom

Nachdem im ersten Teil der Arbeit die Effekte von Rapamycin, Celecoxib und Pioglitazon auf Melanomzellen untersucht worden sind, sollten nun die gleichen Analysen mit Angiosarkomzelllinien durchgeführt werden. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurden die für Melanomzellen etablierten Versuchsbedingungen beibehalten. Die einzusetzenden Zellzahlen mussten aufgrund der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften an die jeweilige Zelllinie angepasst werden. Beim Zentrifugieren der Angiosarkomzellen konnte ein Zellverlust um bis zu 50% beobachtet werden. Da bei der Vorbereitung der Zellzyklusanalyse mehrere Zentrifugationsschritte nötig sind, konnte diese Untersuchung nicht durchgeführt werden.

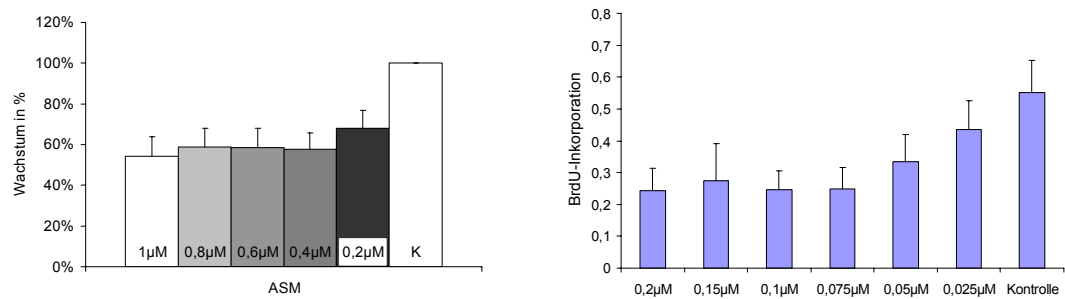
#### 4.3.1 Antiproliferative Effekte von Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon

Die Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von Celecoxib, Rapamycin und Pioglitazon auf Angiosarkomzellen erfolgte mit Hilfe des alamarBlue<sup>TM</sup> und BrdU Tests. Hierzu wurden die humanen Angiosarkomzelllinien ASM und Iso Has und die murinphänotypische Angiosarkomzelllinie ISOS 1 für 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Für Rapamycin wurden zunächst Konzentrationen von 5 bis 0,05  $\mu\text{M}$  eingesetzt und anschließend der Bereich von 1 bis 0,025  $\mu\text{M}$  genauer untersucht. Für Celecoxib lag die Konzentration zunächst zwischen 100 und 0,5  $\mu\text{M}$  und anschließend bei 60 bis 1  $\mu\text{M}$ .

Rapamycin bewirkte in den drei untersuchten Angiosarkomzelllinien eine signifikante dosisabhängige Wachstumsinhibition ( $p > 0,001$ ). Interessanterweise hemmte 1  $\mu\text{M}$  Rapamycin das Wachstum von ASM und Iso Has Zellen im alamarBlue<sup>TM</sup> Test nur um  $46\% \pm 10\%$  und  $29\% \pm 7\%$ , während bei derselben Konzentration in BrdU Test praktisch keine proliferierenden Zellen mehr nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurde für die beiden Zelllinien mit dem BrdU Test zusätzlich der Konzentrationsbereich von 0,2 bis 0,025  $\mu\text{M}$  Rapamycin untersucht. Mit 0,05  $\mu\text{M}$  Rapamycin konnte bei ASM Zellen noch eine Hemmung der Zellproliferation um  $39\% \pm 15\%$  und bei Iso Has Zellen um  $46\% \pm 19\%$  erreicht werden (Abb. 4.23 und 4.24). Auch für ISOS 1 Angiosarkomzellen ergab sich bei der Behandlung mit Rapamycin eine signifikante dosisabhängige Wachstumshemmung ( $p > 0,001$ ), allerdings waren die Effekte im Vergleich zu ASM und Iso Has Angiosarkomzellen geringer ausgeprägt. Durch 0,05  $\mu\text{M}$  Rapamycin wurde die Zellproliferation nur noch um  $11\% \pm 10\%$  gehemmt ( $p > 0,001$ ). (Abb. 4.27).

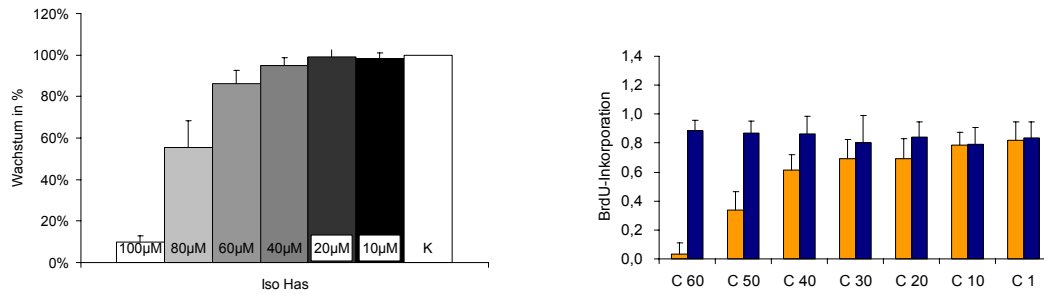


**Abbildung 4.23** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in Iso Has Angiosarkomzellen. Die durch den alamarBlue<sup>TM</sup> Test gewonnenen Ergebnisse wurden mit der Negativkontrolle (Medium) ins Verhältnis gesetzt (n=20). Die BrdU Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12).

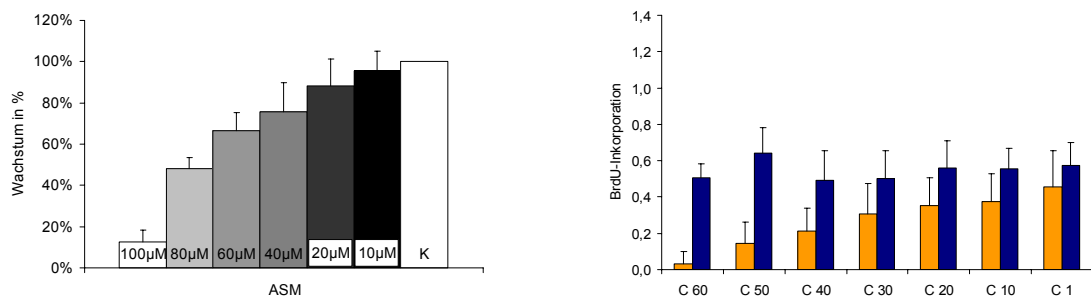


**Abbildung 4.24** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in ASM Angiosarkomzellen. Die durch den alamarBlue<sup>TM</sup> Test gewonnenen Ergebnisse wurden mit der Negativkontrolle (Medium) ins Verhältnis gesetzt (n=20). Die BrdU Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=24).

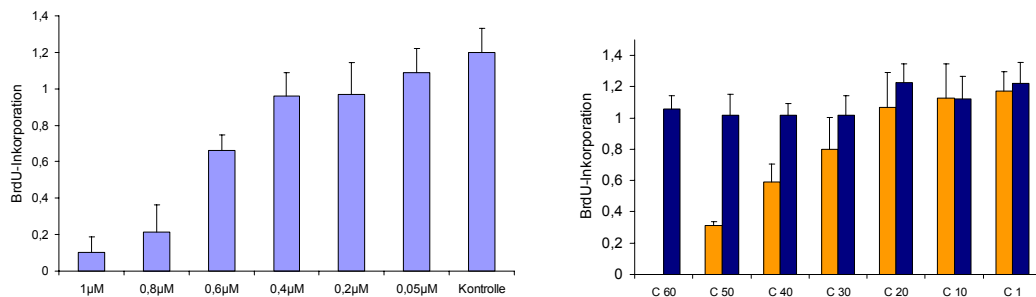
Auch die Behandlung der Angiosarkomzellen mit Celecoxib resultierte in einer dosisabhängigen Hemmung der Zellproliferation (Abb. 4.25 und 4.26). Wie schon bei Rapamycin unterschieden sich die Ergebnisse des alamarBlue<sup>TM</sup> und BrdU Tests erheblich. Während 60  $\mu$ M Celecoxib im alamarBlue<sup>TM</sup> Test eine Wachstumshehmung um  $31\% \pm 11\%$  für ASM und  $14\% \pm 6\%$  für Iso Has verursachte, konnten für diese Konzentration im BrdU Test kaum proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Die Wirkung von Pioglitazon wurde nur für Iso Has Zellen untersucht. Weder im alamarBlue<sup>TM</sup> noch im BrdU Test konnten antiproliferative Effekte auf Angiosarkomzellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.25** Wachstumsinhibition durch Celecoxib (■) in Iso Has Angiosarkomzellen. Die durch den alamarBlue™ Test gewonnenen Ergebnisse wurden mit der Negativkontrolle (DMSO, ■) ins Verhältnis gesetzt (n=20). Die BrdU Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=12).



**Abbildung 4.26** Wachstumsinhibition durch Celecoxib (■) in ASM Angiosarkomzellen. Die durch den alamarBlue™ Test gewonnenen Ergebnisse wurden mit der Negativkontrolle (DMSO, ■) ins Verhältnis gesetzt (n=8). Die BrdU Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation (n=18).

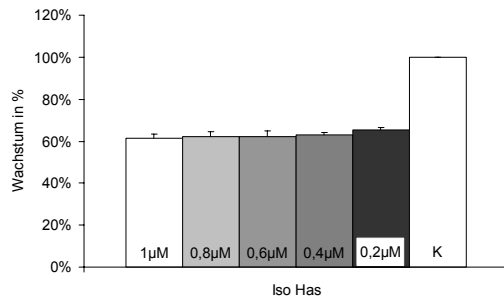


**Abbildung 4.27** Wachstumsinhibition durch Rapamycin (n= 18) und Celecoxib (■) (n=12) in ISOS 1 Angiosarkomzellen. Die BrdU Inkorporation ist ein direktes Maß der Zellproliferation.

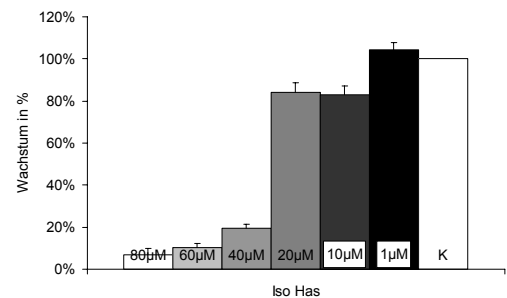
Für Melanomzellen konnte gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung der eingesetzten Medikamente bei anderen Konzentrationsbereichen auftritt, wenn die Substanzen in FKS-freiem Medium gelöst werden. Ob diese Beobachtung auch für Angiosarkomzellen zutrifft wurde exemplarisch für Iso Has Zellen untersucht.

Unter serumfreien Bedingungen führte Rapamycin im alamarBlue™ Test in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer Wachstumsinhibition von 35% bis 40% ( $p > 0,001$ ) (Abb. 4.28). Diese Werte konnten im BrdU Test bestätigt werden. Ähnlich wie bei den Melanomzellen waren die wachstumshemmenden Effekte von in serumfreiem Medium gelösten Celecoxib stärker als unter normalen Kulturbedingungen (Abb.4.29). Während 60µM Celecoxib die Zellproliferation im alamarBlue Test unter serumfreien Bedingun-

gen um  $90\% \pm 2\%$  hemmte, betrug die Wachstumsinhibition bei der gleichen Konzentration unter Standardbedingungen  $14\% \pm 6\%$  ( $p > 0,001$ ).



**Abbildung 4.28** Wachstumsinhibition durch Rapamycin in Iso Has Angiosarkomzellen unter serumfreien Bedingungen (n=8)

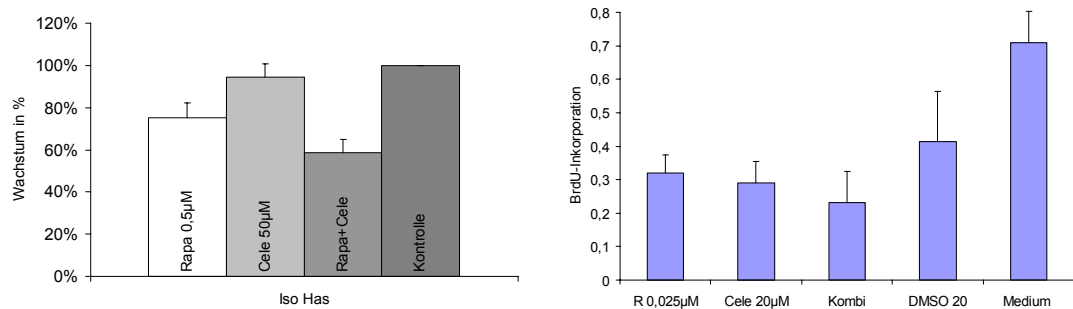


**Abbildung 4.29** Wachstumsinhibition durch Celecoxib in Iso Has Angiosarkomzellen unter serumfreien Bedingungen (n=8)

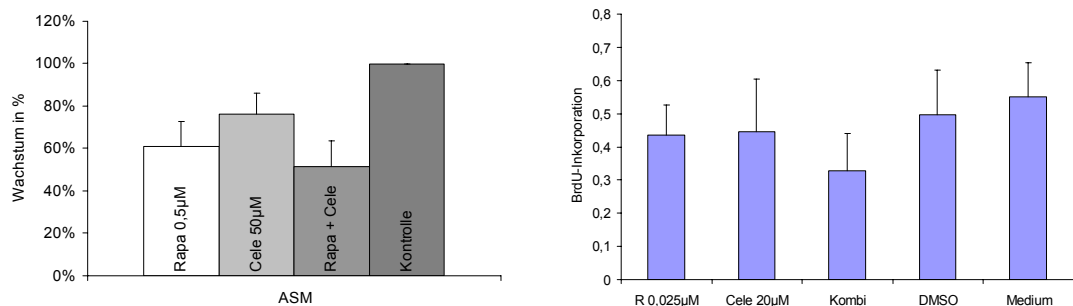
## Kombinationen

Nachdem gezeigt wurde, dass Rapamycin und Celecoxib als Einzelsubstanzen die Proliferation aller Angiosarkomzelllinien effektiv hemmen, sollte untersucht werden, ob das antiproliferative Potential durch die Kombination beider Substanzen zusätzlich gesteigert werden kann. Da die Ergebnisse des BrdU und des alamarBlue™ Test stark voneinander abwichen, wurden auch für die Kombinationsbehandlung für die beiden Testverfahren unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Im alamarBlue™ Test war die Kombination aus  $0,5\mu\text{M}$  Rapamycin und  $50\mu\text{M}$  Celecoxib effektiver als die jeweiligen Einzelsubstanzen. In Iso Has Zellen hemmte  $0,5\mu\text{M}$  Rapamycin das Zellwachstum um  $25\% \pm 7\%$  und  $50\mu\text{M}$  Celecoxib um  $5\% \pm 6\%$ , während die Kombination zu einer signifikanten Verstärkung der Wachstumsinhibition auf  $41\% \pm 6\%$  führte ( $p > 0,001$ ). In ASM Zellen war die Steigerung der antiproliferativen Effekte von  $39\% \pm 12\%$  durch Rapamycin und  $24\% \pm 10\%$  durch Celecoxib auf  $48\% \pm 12\%$  durch die Kombination nicht signifikant. Da im BrdU Test das Zellwachstum von ASM und Iso Has Zellen durch  $0,5\mu\text{M}$  Rapamycin um über 90% gehemmt wurde, konnte für diese Konzentrationen keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Kombinationsbehandlung effektiver ist als die Einzelsubstanzen. Aus diesem Grund wurde für die beiden Zelllinien  $0,025\mu\text{M}$  Rapamycin mit  $20\mu\text{M}$  Celecoxib kombiniert. In ASM Zellen wurde die antiproliferative Wirkung von  $23\% \pm 13\%$  durch Rapamycin und  $20\% \pm 15\%$  durch Celecoxib durch die Kombination signifikant auf  $38\% \pm 19\%$  gesteigert ( $p > 0,05$ ). In Iso Has Zellen war die Steigerung des antiproliferativen Effektes mit  $49\% \pm 9\%$  durch Rapamycin,  $34\% \pm 14\%$  durch Celecoxib und  $53\% \pm 18\%$  durch die Kombination nicht

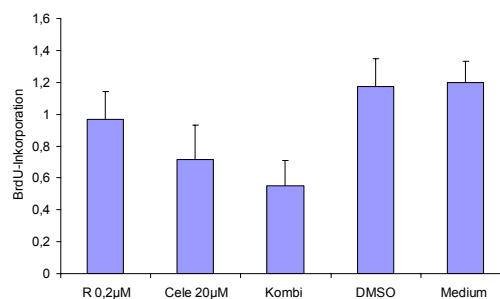
signifikant. Da die Effekte von Rapamycin auf ISOS 1 Zellen geringer waren als auf die ASM und Iso Has, wurde für diese Zelllinie 0,2 $\mu$ M Rapamycin mit 20 $\mu$ M Celecoxib kombiniert. Auch bei ISOS 1 Zellen war die Kombination mit 54%  $\pm$  6% Wachstumsinhibition signifikant effektiver als die Einzelsubstanzen Rapamycin mit 19%  $\pm$  14% und Celecoxib mit 38%  $\pm$  15% ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.30** Wachstumsinhibition durch Kombination aus Rapamycin und Celecoxib in Iso Has Angiosarkomzellen. Für den alamarBlue™ Test wurden 0,5 $\mu$ M Rapamycin und 50 $\mu$ M Celecoxib eingesetzt (n=12), für den BrdU Test 0,025 $\mu$ M Rapamycin und 20 $\mu$ M Celecoxib (n=12).



**Abbildung 4.31** Wachstumsinhibition durch Kombination aus Rapamycin und Celecoxib in ASM Angiosarkomzellen. Für den alamarBlue™ Test wurden 0,5 $\mu$ M Rapamycin und 50 $\mu$ M Celecoxib eingesetzt (n=8), für den BrdU Test 0,025 $\mu$ M Rapamycin und 20 $\mu$ M Celecoxib (n=24).



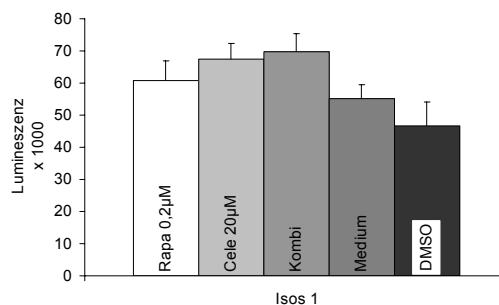
**Abbildung 4.32** Wachstumsinhibition durch Kombination aus 0,2 $\mu$ M Rapamycin und 20 $\mu$ M Celecoxib in ISOS 1 Angiosarkomzellen (n=18)

### 4.3.2 Induktion der Apoptose

Um zu untersuchen, ob Celecoxib und Rapamycin Einfluss auf die Apoptoserate von Angiosarkomzellen nehmen, wurden ASM, Iso Has und ISOS 1 Zellen für 24h mit 0,2 $\mu$ M Rapamycin, 20 $\mu$ M Celecoxib oder der Kombination beider Substanzen behandelt. Wie bei den Wachstumsversuchen wurden die Substanzen in Kulturmedium mit 5% FKS gelöst, als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Kulturmedium bzw. Kulturmedium mit dem entsprechenden Volumen an DMSO behandelt.

Bei ISOS 1 Angiosarkomzellen führte die Inkubation mit den Testsubstanzen zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate um den Faktor 1,4 für Celecoxib ( $p < 0,001$ ) und um den Faktor 1,1 für Rapamycin ( $p < 0,01$ ). Die durch die Kombination beider Substanzen erreichte Steigerung der Apoptoserate um den Faktor 1,5 erreichte gegenüber der Einzelbehandlung mit Celecoxib keine statistische Signifikanz (Abb. 4.33).

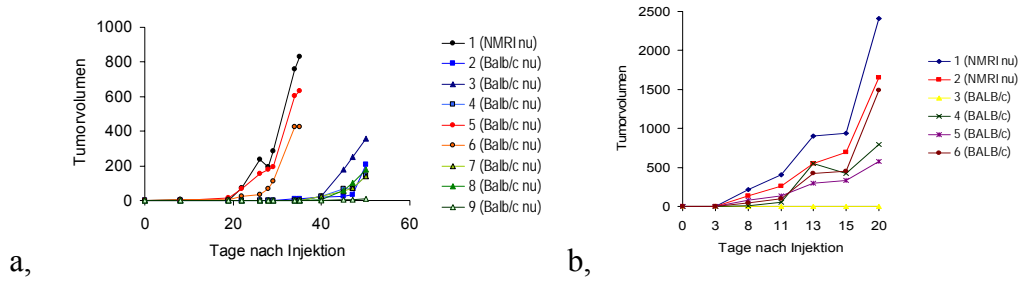
Die Analyse der Caspase 3 und 7 Aktivität lieferte für ASM und Iso Has Angiosarkomzellen bei mehrfacher Wiederholung widersprüchliche Ergebnisse, so dass aufgrund dieser Daten keine zuverlässige Aussage über die Apoptoserate getroffen werden kann. Unter Berücksichtigung der gesteigerten Apoptoserate in ISOS 1 Zellen, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass Celecoxib und Rapamycin auch in anderen Angiosarkomzelllinien proapoptotische Effekte besitzen.



**Abbildung 4.33** Induktion der Apoptose in ISOS 1 Angiosarkomzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0,2 $\mu$ M Rapamycin, 20 $\mu$ M Celecoxib oder der Kombination beider Substanzen. Medium diente als Negativkontrolle für die Rapamycinbehandlung und DMSO für die Celecoxib- und Kombinationsbehandlung. Das Lumineszenzsignal korreliert direkt mit der Caspase 3 und 7 Aktivität und somit mit der Apoptoserate (n=16).

#### **4.3.3 Propagation von Angiosarkomen in immundefizienten Mäusen**

Da sich die Expansion der Angiosarkomzelllinien *in vitro* aufgrund starker Schwankungen im Wachstumsverhalten als schwierig erwies, sollten durch Propagation der Angiosarkomzellen in immundefizienten Mäusen Angiosarkomzelllinien mit verbesserten Wachstumseigenschaften etabliert werden. Gleichzeitig konnte das tumorigene Potential der verwendeten Angiosarkomzelllinien vergleichend beurteilt werden. Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Experimentelle Chirurgie je  $2 \times 10^6$  Zellen der Angiosarkomzelllinien ASM, Iso Has und ISOS 1 subkutan in die Flanke von in 8-12 Wochen alten, männlichen SCID, NMRI nu/nu oder Balb/c nu/nu Mäuse injiziert. Im weiteren Verlauf wurden das Gewicht der Mäuse und die Größe der entstandenen Tumoren in regelmäßigen Abständen, bei Bedarf täglich, kontrolliert. Selbst nach 14 Wochen konnte für die beiden humanen Angiosarkomzelllinien ASM ( $n = 3$ ) und Iso Has ( $n = 2$ ) kein Tumorwachstum an den Injektionsstellen nachgewiesen werden. Die murinphänotypische Angiosarkomzelllinie ISOS 1 bildete 5 bis 7 Wochen nach der Injektion in Balb/c nu/nu oder NMRI nu/nu Mäuse subkutane Tumore ( $n = 5$ ). Die aus den Tumoren etablierten Zelllinien zeigten recht unterschiedliches Wachstumsverhalten, im Vergleich mit der Originalzelllinie ISOS 1 war die Verdoppelungszeit nur in einer der drei neuen Zelllinien verkürzt. Durch wiederholte subkutane Implantation der neu gebildeten Tumoren bzw. Injektion der daraus neu etablierten Zelllinien in immundefiziente Mäuse konnte die Aggressivität der Tumoren gesteigert werden, so dass schon 10 bis 20 Tage nach der Implantation Tumorknoten beobachtet werden konnten ( $n = 11$ ). Beim dritten Transfer wurden die aus den gebildeten Tumoren isolierten Angiosarkomzellen zusätzlich in immunkompetente Balb/c Mäuse injiziert. Auch hier konnten nach 20 Tagen Tumorknoten nachgewiesen werden ( $n = 2$ ) (Abb. 4.34b). Da das Ziel dieser Arbeit die Optimierung der Angiosarkomzelllinien und nicht die Etablierung eines Tiermodells war, konnte aufgrund der geringen Tierzahl keine solide Statistik für das tumorigene Potential der Angiosarkomzellen in immundefizienten Mäusen erstellt werden.



**Abbildung 4.34** Tumorwachstum nach subkutaner Inokulation von Angiosarkomzellen in NMRI und Balb/c Nacktmäuse. a, Injektion von ISOS 1 Angiosarkomzellen, b, 3. Transfer der aus den entstandenen Tumoren isolierten Angiosarkomzellen nach Passage 5 bzw. 11. Zwischen dem Tumorwachstum in Balb/c nu/nu und NMRI nu/nu Mäusen konnte kein Unterschied detektiert werden. Das Tumolvolumen (in mm<sup>3</sup>) wurde nach der Messung des kurzen (a) und langen (b) Tumordurchmessers mit folgender Formel berechnet:  $V = \pi/6 \times 0,5 \times a^2 \times b$ .



**Abbildung 4.35** Tumorwachstum am 35. Tag nach subkutaner Injektion von  $2 \times 10^6$  Zellen ISOS 1 in eine Balb/c nu/nu Maus.



#### **4.4 Angiogeneseassays**

In den vorherigen Teilen der Arbeit wurde die direkte Wirkung von Celecoxib und Rapamycin auf Melanom und Angiosarkomzellen untersucht. In zahlreichen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Medikamente zusätzlich Effekte auf das peritumorale Stroma und insbesondere auf die tumorversorgenden Blutgefäße haben. Dass Celecoxib und Rapamycin als Einzelsubstanzen in der Lage sind, die Neoangiogenese zu hemmen, wurde mehrfach beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, ein Testverfahren zur Beurteilung der antiangiogenetischen Potenz von Celecoxib und Rapamycin *in vitro* zu etablieren. Zusätzlich sollten untersucht werden, ob eine Kombinationsbehandlung mit Rapamycin und Celecoxib zu einer Potenzierung der antiangiogenetischen Effekte führt.

##### **4.4.1 Rat aortic Ring assay**

Der Rat Aortic Ring assay ist ein *ex vivo* Testverfahren zur Beurteilung der Angiogenese *in vitro*. Hierbei wird eine Rattenaorta in 1mm dicke Ringe geschnitten, die anschließend in mit Matrigel beschichteten 24-Well Platten kultiviert werden. Nach einigen Tagen können Aussprossungen aus den Aortenringen beobachtet werden. *In vivo* sind neben Endothelzellen auch andere Zelltypen an der Entstehung neuer Blutgefäße mit beteiligt. Mit Hilfe des Rat aortic ring assays können diese Zellen mit erfasst werden. Aus diesem Grund könne die physiologischen Prozesse der Angiogenese in diesem Testsystem besser beurteilt werden als mit anderen *in vitro* Angiogenesetest.

Zu Versuchsbeginn werden 24-Well Platten mit Matrigel beschichtet, einer löslichen Extrazellulärsubstanz, die in diesem Versuchsaufbau zwei unterschiedliche Funktionen erfüllt. Da Matrigel neben seinem Hauptbestandteil Laminin viele Wachstumsfaktoren beinhaltet, werden ideale Bedingungen für das Aussprossen neuer Blutgefäße geschaffen. Zusätzlich ist Matrigel bei 0° C eine sehr visköse Substanz, die bei Raumtemperatur schnell aushärtet. Diese Eigenschaft wird ausgenutzt um die Aortenringe im Well anzuheften. Durch eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank soll der Ring vor Zugabe der Testsubstanzen fest im Well fixiert werden. Erste Gefäßaussprossungen sind nach 4 bis 5 Tagen zu erwarten. Aufgrund dieser langen Inkubationszeit ist es erforderlich, das Kulturmedium in regelmäßigen Abständen zu wechseln. Es ließ sich jedoch nicht vermeiden, dass ein Teil der Ringe beim Mediumwechsel von der Unterlage gelöst wurden und abschwammen. Auch durch größere Volumina an Matrigel oder eine Über-

schichtung der Ringe mit Matrigel konnten die Ablösung einiger Ringe nicht verhindert werden. In diesem Zustand konnte das Ausmaß der Angiogenese nicht mehr korrekt beurteilt werden. Aus diesem Grund wurde als alternatives Testverfahren zur Beurteilung der Angiogenese ein tubular formation Assay durchgeführt.

#### **4.4.2 Tubular formation Assay**

##### *4.4.2.1 Etablierung der Testmethode*

Mit Hilfe des tubular formation assays kann die Tendenz von Endothelzellen, *in vitro* gefäßähnliche Strukturen zu bilden, beurteilt werden. Hierzu sollten HUVEC Zellen in Matrigel<sup>TM</sup> beschichteten 24-Well Platten kultiviert und die Neoangiogenese durch Beurteilung der Gefäßdichte quantifiziert werden. Um die geeignete Zelldichte und Inkubationszeit zu bestimmen, wurden  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät und Zelldichte und Veränderung in der Zellmorphologie und -verteilung zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Erste gefäßähnliche Strukturen wurden nach 16h sichtbar, nach 20h konnten Gefäßformationen in allen Wells nachgewiesen werden. Die Gefäßformationen blieben über einige Stunden stabil, lösten sich aber dann wieder auf, so dass nach 48h nur noch vereinzelte Tubuli beobachtet werden konnten. Aus diesem Grund wurde eine Inkubationszeit von 24h ab Aussäen der Zellen festgelegt. Die geeignete Zelldichte lag bei  $9 \times 10^4$  Zellen pro Well. Da die Zellen die Tendenz zeigten, sich in der Mitte und am Rand des Wells zu sammeln und die dazwischen liegenden Bereiche auszusparen, wurde die Verteilung der Zellen im Well während der Anheftungsphase mehrfach unter dem Mikroskop beurteilt und durch Schwenken der Platte versucht, die Zellen gleichmäßig im Well zu verteilen.

Interessanterweise bildeten HUVEC Zellen nur dann Gefäßformationen, wenn sie in serumfreiem Medium kultiviert wurden. Enthielt das Kulturmedium 5% FKS, konnten unabhängig von der Zelldichte zu keinem Zeitpunkt gefäßähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden alle Versuche in serumfreiem Endothelzellmedium durchgeführt. Zusätzlich wurde auch auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren, die sich unter Standardbedingungen im Kulturmedium befinden, verzichtet. Um die Vitalität der Zellen zu Versuchsbeginn zu gewährleisten, wurden die Zellen zuvor in mit Gelatine beschichteten T<sub>75</sub> Zellkulturflaschen kultiviert, wobei das Kulturmedium sowohl 10% FKS als auch Wachstumsfaktoren enthielt. Die Versuche wurden durchgeführt, wenn die Zellen ca. 80% Konfluenz erreicht hatten. Um eine Verfälschung der

Ergebnisse durch eine ungleiche Verteilung des Matrigel<sup>TM</sup> in den Wells zu verhindern, wurden spezielle, bereits mit einer dünnen Schicht aus Matrigel beschichtete 24-Well Platten verwendet.

Im nächsten Schritt sollten die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen Celecoxib und Rapamycin behandelt werden. Da diese Substanzen auch die Einfluss auf die Migration und Invasion der Zellen haben könnten, wurden die Zellen zunächst nur in serum-freiem Kulturmedium ausgesät und für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe der Medikamente erfolgte erst, nachdem das Anwachsen der Zellen durch Beurteilung am Mikroskop sichergestellt wurde. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass die Unterschiede in der Gefäßformation nicht auf die Hemmung der Migration oder unterschiedliches Anheften der Zellen an der Unterlage zurückzuführen sind.

Zur Auswertung der Versuche sollten die Gefäßformationen in den einzelnen Wells unter dem Mikroskop beurteilt und mit Hilfe einer videogesteuerten Digitalkamera fotografiert werden. Um zu verhindern, dass sich die Gefäßformationen während der Auswertephase veränderten, wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert und zur besseren Darstellung der Gefäßformationen mit Hämalaun-Eosin angefärbt. Die fixierten 24-Well-Platten konnten bis zur Auswertung bei 4°C gelagert werden.

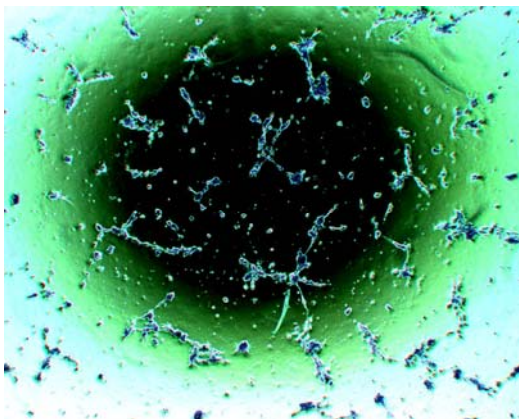
#### *4.4.2.2 Etablierung der Auswertung*

Um eine quantitative Aussage über den Grad der Gefäßneubildung treffen zu können, wurden von jedem Well mit Hilfe einer videogesteuerten Digitalkamera 20 Fotos in 4x Vergrößerung angefertigt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass weder Überlappungen noch größere Lücken zwischen den fotografierten Arealen entstanden. Gerade in Bereichen mit sehr hoher oder sehr geringer Zelldichte, in denen pro Gesichtsfeld keine markanten Strukturen als Orientierungshilfe dienten, war dies jedoch in der Praxis kaum durchführbar. Die Auswertung der Digitalfotos sollte mit Hilfe der Image J Software erfolgen. Hierzu sollten alle tubulären Strukturen nachgezeichnet und deren Länge bestimmt werden. Durch die gleichzeitige Messung der auswertbaren Fläche sollte die Gefäßdichte als Quotient aus Gesamtlänge der Tubuli und Gesamtfläche pro Well berechnet werden. Da die Entscheidung, ab welcher Größe und Wanddicke eine Struktur als Tubulus gewertet wird, stark vom Betrachter abhängt, konnte durch diese Methode keine objektive Aussage über den Grad der Gefäßneubildung getroffen werden. Aus diesem Grund wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet. Alternativ wurden die Gefäßformationen in Kategorien von 0 bis 3 eingeteilt und eine semiquantitative Analy-

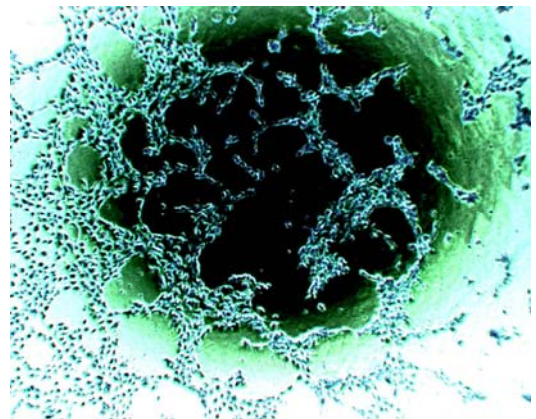
se durchgeführt, wobei die Strukturen in der Mitte und im Randbereich der Wells separat beurteilt wurden. Tabelle 4.5 und die Abbildungen 4.34-4.37 fassen die Einteilungskriterien zusammen.

Kategorie	Mitte	Rand
0	Keine Tubuli tote Zellen	Nur vereinzelt Zellen sichtbar
1	Einzelne längliche Zellen Tendenz zur Gefäßformation	Zellen im gesamten Randbereich Vereinzelt Tubuli
2	Viele Tubuli Zellhaufen und plumpe Zellen Begrenzung durch viele Zellen	Zellen im gesamten Randbereich, mehr Tubuli
3	Viel dünne, schlanke Tubuli Begrenzung durch einzelne Zellen	Sehr viele Tubuli im gesamten Randbereich

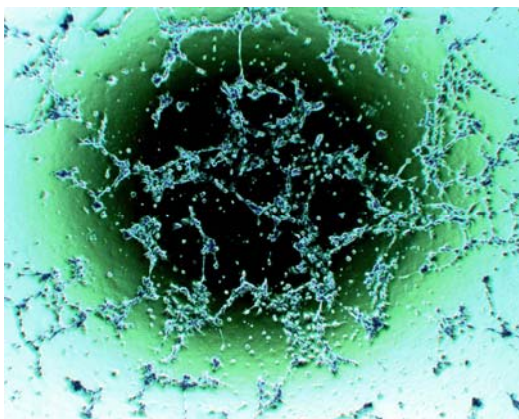
**Tabelle 4.5** Einteilungskriterien für die semiquantitative Auswertung des tubular Formation assays. Aufgrund unterschiedlicher Zellverteilung wurden Mitte und Randbereich separat beurteilt.



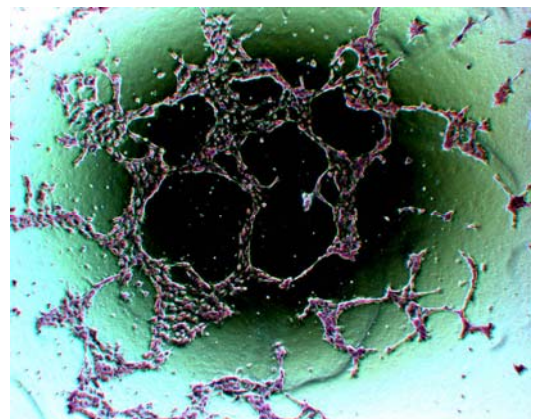
**Abbildung 4.36** Kategorie 0, Mitte



**Abbildung 4.38** Kategorie 2, Mitte



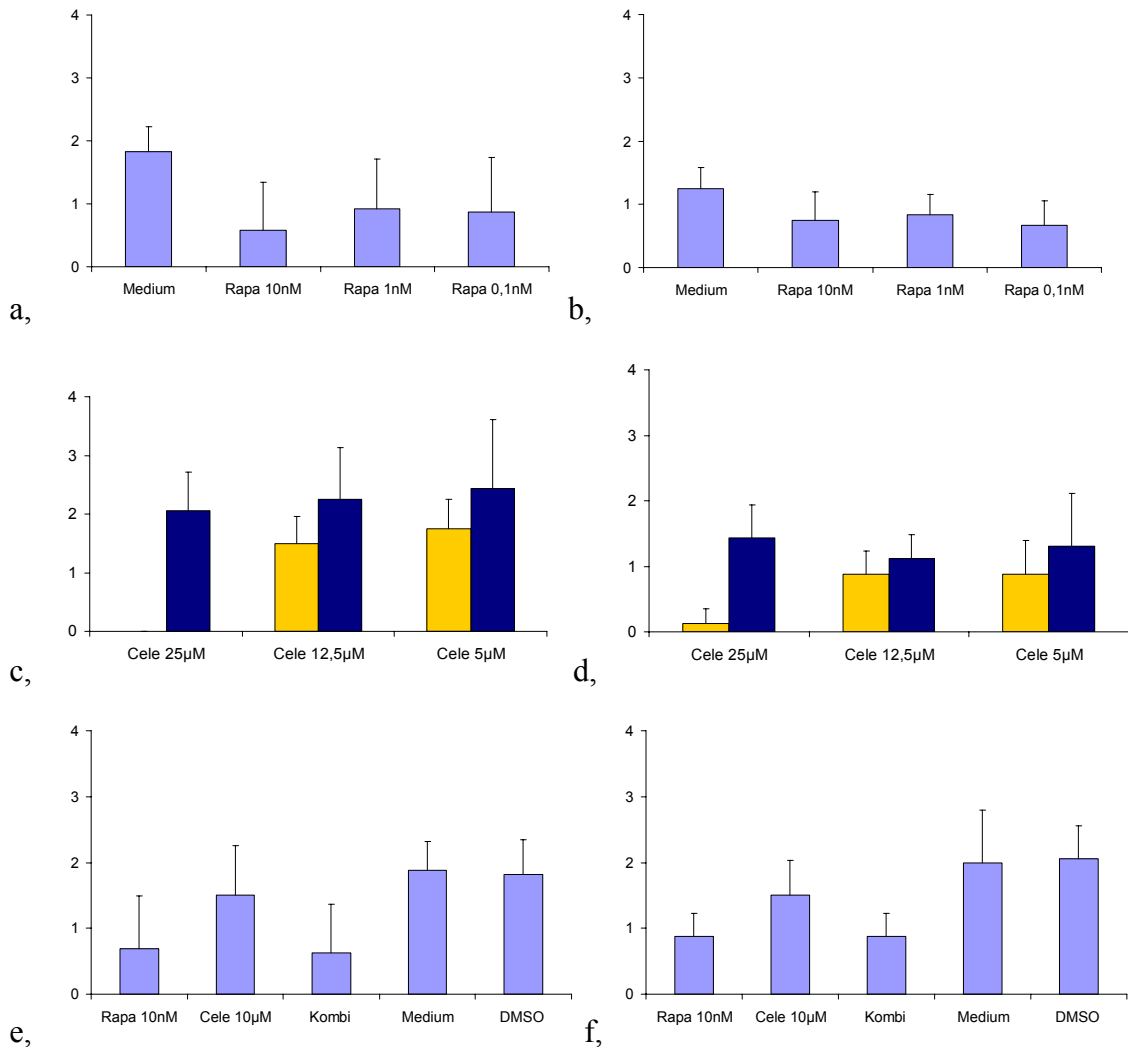
**Abbildung 4.37** Kategorie 1, Mitte



**Abbildung 4.39** Kategorie 3, Mitte

#### 4.4.2.3 *Ergebnisse des tubular formation assays*

HUVEC Zelle wurden für 22 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Rapamycin (0,1nM, 1nM und 10nM) und Celecoxib (5µM, 12,5µM und 25µM) oder der Kombination aus 10nM Rapamycin und 10µM Celecoxib inkubiert. Im Vergleich zu den jeweiligen Negativkontrollen konnte bei allen verwendeten Medikamentenkonzentrationen eine Hemmung der Gefäßbildung beobachtet werden (Abb. 4.38). Diese Effekte waren in der Mitte der Wells stärker ausgeprägt als im Randbereich. Sowohl in den mit 10nM Rapamycin als auch in den mit 25µM Celecoxib behandelten Wells konnten nur noch vereinzelte lebende Zellen erkannt werden. 10nM Rapamycin hemmten die Angiogenese effektiver als 10µM Celecoxib, die Effekte der Kombination aus 10nM Rapamycin und 10µM Celecoxib waren mit denen von Rapamycin als Einzelsubstanz vergleichbar. Hierbei muss allerdings eingeräumt werden, dass die antiangiogenetische Wirkung von Rapamycin als Einzelsubstanz schon so ausgeprägt war, dass eine Steigerung der Effektivität durch eine Kombinationsbehandlung kaum erzielt werden konnte.



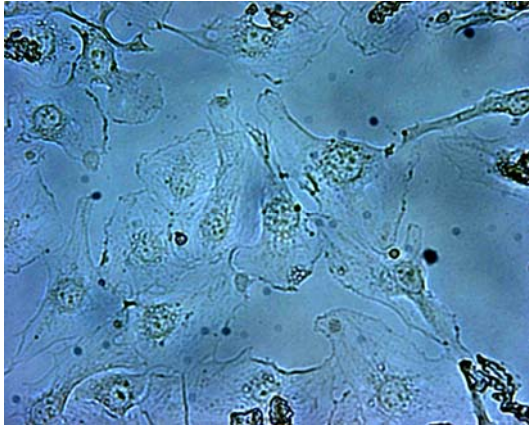
**Abbildung 4.40** Semiquantitative Auswertung des tubular formation Assays. HUVEC Zellen wurden für 22h mit Rapamycin (a,b), Celecoxib (■,c,d), Kombination aus 10nM Rapamycin und 10µM Celecoxib (e,f) und den jeweiligen Negativkontrollen (Medium für Rapamycin, DMSO (■) für Celecoxib und Kombination) behandelt. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Zellen in den Wells wurde Mitte (a,c,e) und Randbereich (b,d,f) der Wells separat beurteilt (n=8).

Neben nicht alterierten Endothelzellen wurden auch die Angiosarkomzelllinien Iso Has und ISOS 1 auf ihr angiogenetisches Potential hin untersucht (Abb. 4.39 - 4.42).

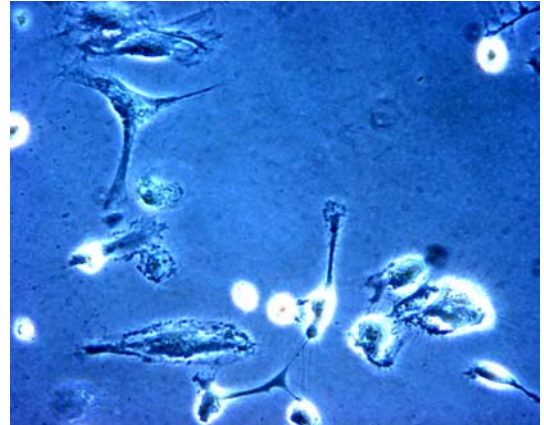
Iso Has Angiosarkomzellen veränderten nach 24 stündiger Inkubation in serumfreiem Medium ihre Zellmorphologie. Die sonst recht breiten, mit viel Zytoplasma umgebenen und fast durchsichtigen Zellen flachten ab und bildeten dünne Zellausläufer. Diese Veränderungen können als Tendenz, gefäßartige Strukturen zu bilden, gewertet werden. Die geeignete Zellzahl für Iso Has Angiosarkomzellen lag bei  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well. Im Gegensatz dazu konnte für ISOS 1 Angiosarkomzellen keine Veränderung in der Zellmorphologie oder Verteilung der Zellen im Well nachgewiesen werden. Schon in zellkulturbeschichteten T75 Flächen sind ISOS 1 Zellen spindelförmig und bilden spontan



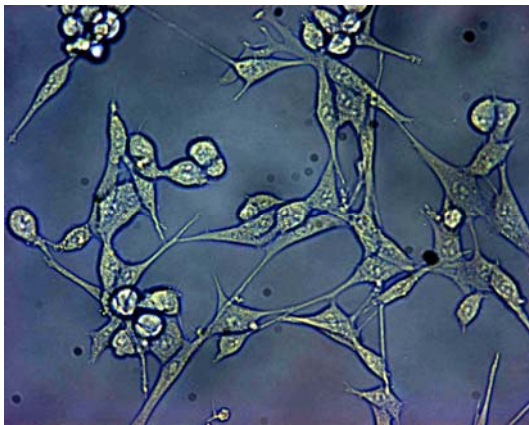
ringartige Strukturen. Durch Inkubation dieser Zellen auf Matrigel konnte die Tendenz zur Gefäßformation jedoch nicht gesteigert werden. Da in dieser Arbeit die Wirkung von Celecoxib und Rapamycin auf die nicht-entarteten Endothelzellen untersucht werden sollte, wurde der tubular formation assay für die Angiosarkomzellen nicht weiter durchgeführt.



**Abbildung 4.41** Iso Has Angiosarkomzellen in T<sub>75</sub> Zellkulturflasche, fixiert



**Abbildung 4.43** Iso Has Angiosarkomzellen in Matrigel<sup>TM</sup> beschichteten 24-Well Platten, nativ.



**Abbildung 4.42** Isos1 Angiosarkomzellen in T<sub>75</sub> Zellkulturflasche, nativ.



**Abbildung 4.44** Isos 1 Angiosarkomzellen in Matrigel<sup>TM</sup> beschichteten 24-Well Platten, nativ.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 PPAR $\gamma$ Agonisten

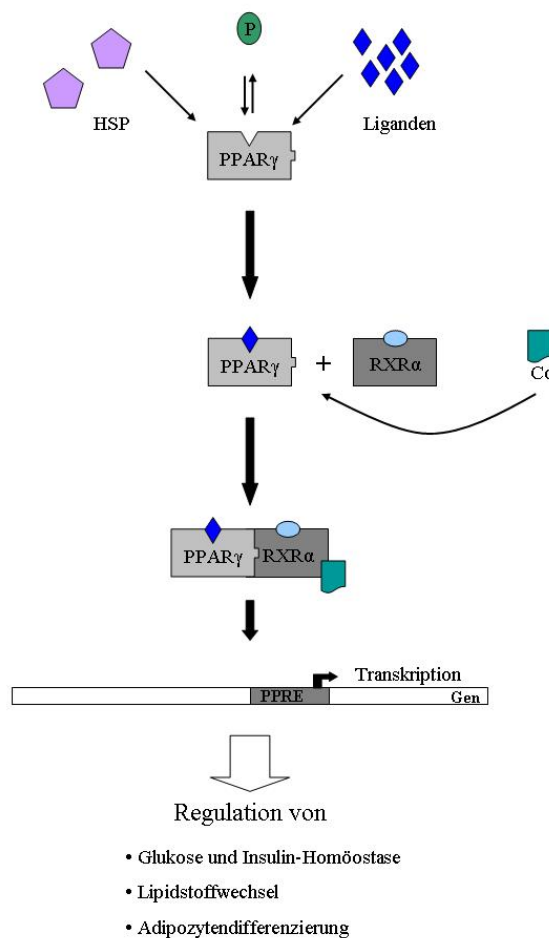
#### 5.1.1 PPAR $\gamma$ und dessen Rolle im Stoffwechsel (8, 27)

PPARs (peroxisom proliferator activated receptor) sind nukleäre Hormonrezeptoren, die in der Regulation des Zellstoffwechsels eine entscheidende Position einnehmen. Als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren bilden die PPARs mit dem Retinoid X Rezeptor RXR Heterodimere und antworten auf extrazelluläre Stimuli mit der Regulation der Genexpression. Es wurden 3 Isoformen identifiziert, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$ , die sich sowohl in ihren selektiven Liganden als auch in der Verteilung auf verschiedene Gewebetypen unterscheiden. Während PPAR $\alpha$  vor allem in Niere, Myokard und Leber nachgewiesen werden kann, ist PPAR $\beta/\delta$  in zahlreichen Gewebetypen exprimiert. Insbesondere die Funktion des PPAR $\gamma$ , der vor allem in Zellen des Immunsystems und in Adipozyten exprimiert ist, wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Zu den natürlichen Liganden von PPAR $\gamma$  zählen lipophile Substanzen wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren, oxidierte Lipide und Eikosanoid-Derivate, wobei Prostaglandin J<sub>2</sub> den potentesten endogenen Liganden darstellt. PPAR $\gamma$  spielt in der Adipozytendifferenzierung, im Glukosestoffwechsel und in der Lipid-Homöostase eine Schlüsselrolle. Da die Aktivierung von PPAR $\gamma$  die Serumglukosekonzentration reduziert, werden PPAR $\gamma$  Agonisten wie Pioglitazon, Ciglitazon und Rosiglitazon zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt. Troglitazon musste aufgrund starker hepatotoxischer Wirkung vom Markt genommen werden.

#### 5.1.2 Mechanismus der transkriptionellen Transaktivierung

Die Aktivierung des PPAR $\gamma$  kann sowohl durch die intrazelluläre Veränderung des PPAR $\gamma$  Phosphorylierungsstatus als auch durch eine Interaktion mit Hitzeschockproteinen erfolgen. Der wichtigste Mechanismus für die PPAR $\gamma$  Aktivierung ist jedoch die direkte Interaktion mit natürlichen oder synthetischen Liganden (28). Nach der Liganden-Aktivierung heterodimerisiert PPAR $\gamma$  mit dem Retinoid X Rezeptor RXR. Der so entstandene PPAR $\gamma$ -RXR Komplex bindet an sequenzspezifische PPAR $\gamma$  response elements (PPRE) und reguliert so die Transkription des Zielgens. Zusätzlich kann die Signaltransduktion nach PPAR $\gamma$  Aktivierung durch so genannte „Korepressoren“ und „Koaktivatoren“ moduliert werden (Abb. 5.1).





**Abbildung 5.1** Aktivierung des PPAR $\gamma$  Signalwegs durch Hitzeschockproteine (HSP), Phosphorylierung (P) und Liganden. Nach der Heterodimerisierung mit dem Retinoid X Rezeptor RXR $\alpha$  bindet der PPAR $\gamma$ -RXR $\alpha$  Komplex an das Peroxisome-Proliferator response Element (PPRE) des Zielgens und reguliert dessen Transkription. „Korepressoren“ und „Koaktivatoren“ (Co) modulieren die Signaltransduktion.

### 5.1.3 Direkte antitumorale Effekte der Glitazone

PPAR $\gamma$  nimmt nicht nur in der Regulation des Zellstoffwechsels und der Adipozytendifferenzierung eine entscheidende Position ein. Die Ergebnisse zahlreicher präklinischer Studien weisen darauf hin, dass PPAR $\gamma$  auch in Malignomen eine wichtige Rolle spielt. In einer Vielzahl humaner Tumoren konnte PPAR $\gamma$  mRNA oder PPAR $\gamma$  Protein nachgewiesen werden, wobei in einigen Malignomen wie im Glioblastom oder im adrenokortikalen Karzinom im Vergleich zum gesunden Gewebe höhere PPAR $\gamma$  Expressionslevel detektiert wurden (29, 30). Aus diesem Grund wird diskutiert, ob eine Therapie mit PPAR $\gamma$  Agonisten einen selektiven Angriff auf das Tumorgewebe erlaubt. Im Vergleich zu normalen Myometrium reagierten uterine Leiomyome sensibler auf die wachstumsinhibierenden Effekte von Ciglitazon (31). Auch Pioglitazon hatte auf Leukämiezellen stärkere antiproliferative Effekte als auf Blutzellen gesunder Probanden

(32). Diese Beobachtungen treffen aber nicht für alle Tumorentitäten zu. Während PPAR $\gamma$  im normalen Urothel und im gut differenzierten Urothelkarzinom uniform nachgewiesen werden konnte, war die PPAR $\gamma$  Expression in hochgradigen Urothelkarzinomen nur noch heterogen oder sogar negativ. *In vitro* waren die nicht-neoplastischen Urothelzellen weitaus sensibler für die wachstumshemmenden Effekte der PPAR $\gamma$  Liganden. Somit wäre eine Therapie des Urothelkarzinoms mit PPAR $\gamma$  Agonisten mit erheblichen Schäden des gesunden Gewebes verbunden, während das Malignom gegen die Behandlung weitgehend resistent wäre (33).

In dieser Arbeit wurden 6 humane Melanomzelllinien auf ihr PPAR $\gamma$  Expressionsmuster untersucht. PPAR $\gamma$  mRNA konnte in allen Zelllinien nachgewiesen werden, die Höhe der mRNA Expression variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Zelllinien.

Um zu untersuchen, ob eventuelle antineoplastische Effekte der PPAR $\gamma$  Agonisten von der Höhe der PPAR $\gamma$  Expression abhängig sind, wurden A375 Zellen als stark PPAR $\gamma$  exprimierende und Mel Ho und IGR 1 Zellen als gering PPAR $\gamma$  exprimierende Melanomzelllinie für die Versuche ausgewählt. Eine 48-stündige Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Pioglitazon führte in keiner der untersuchten Zelllinien zu einer Veränderung der Proliferationsrate. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der alleinige Nachweis von PPAR $\gamma$  noch keine Prognose für das Ansprechen der Zellen auf eine Therapie mit PPAR $\gamma$  Agonisten zulässt.

Zur Wirkung der Glitazone auf Melanomzellen *in vitro* liegen bereits einige Studien vor. Plancha et al. beobachteten eine dosisabhängige Wachstumsinhibition und Induktion der Apoptose in A375 und WM35 Melanomzellen nach PPAR $\gamma$  Aktivierung durch Ciglitazon und PGJ<sub>2</sub>. Allerdings traten diese Effekte erst bei hohen Konzentrationen beider Substanzen auf (34). In einer anderen Studie konnten A375 Melanomzellen jedoch erst durch Entzug von Aminosäuren für die antiproliferativen und proapoptotischen Effekte von Ciglitazon sensibilisiert werden (35). Freudlsperger beschreibt eine dosisabhängige Wachstumsinhibition von Melanomzellen durch verschiedene Glitazone, wobei Ciglitazon die stärksten und Pioglitazon die schwächsten antiproliferativen Effekte verursachte (36).

Für die Veränderung der Genexpression durch PPAR $\gamma$  Liganden ist eine Heterodimerisierung von PPAR $\gamma$  mit dem Retinoid X Rezeptor RXR notwendig. Auch die Behandlung mit Retinoiden führt zu antitumoralen Effekten wie Inhibition der Zellproliferation der Induktion der Apoptose (37, 38). Durch die gleichzeitige Aktivierung von PPAR $\gamma$

und RXR konnte in einigen Tumoren sogar synergistische bzw. additive antineoplastische Effekte erzielt werden (30, 39-42). Auch in A375 Melanomzellen führte die Inkubation mit Retinolsäure-Analoga zu einer Hemmung des Zellwachstums und Induktion der Apoptose. Da zwischen den mit dem RXR Agonist Methoprensäure behandelten Zellen und der Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden konnte, scheinen die beobachteten antineoplastischen Effekte nicht über den RXR Rezeptor vermittelt zu werden (38). Bei einer immunhistochemischen Untersuchung melanozytärer Läsionen konnte sowohl im Melanom als auch in Melanometastasen im Vergleich zu Nävi ein höherer Prozentsatz an zytoplasmatischen RXR $\alpha$  Rezeptoren nachgewiesen werden (43). Durch die Verschiebung von Transkriptionsfaktoren vom Kern ins Zytoplasma könnte die Heterodimerisierung mit anderen nukleären Rezeptoren erschwert werden. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, warum Pioglitazon in A375 Melanomzellen trotz hoher PPAR $\gamma$  Expressionslevel keine antiproliferativen Effekte besitzt. Klopper et al. postulierten, dass für eine Inhibition des Zellwachstums im Schilddrüsenkarzinom durch PPAR $\gamma$  Agonisten und Retinoide die Expression beider Rezeptoren notwendig ist (44). Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die Ergebnisse einer Studie, in der Rosiglitazon in A375 Melanomzellen durch Induktion von Apoptose und Nekrose das Zellwachstum hemmt. Für diese Effekte wurden PPAR $\gamma$  abhängige Mechanismen verantwortlich gemacht (45), zudem wurde eine Steigerung der PPAR $\gamma$  Expression und eine Translokation von PPAR $\gamma$  vom Zytoplasma in den Kern beobachtet. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass einige der antineoplastischen Effekte der Glitazone über PPAR $\gamma$  unabhängige Signalwege vermittelt werden (46-51). Pioglitazon und Rosiglitazon hemmten die Zellproliferation nur in PPAR $\gamma$  positiven Pankreaskarzinomzellen, während eine Reduktion der Invasivität sowohl in PPAR $\gamma$  positiven als auch negativen Pankreaskarzinomzellen beobachtet wurde (49). Obwohl in oralen Plattenepithelkarzinom kein PPAR $\gamma$  Protein nachgewiesen werden konnte, führte die Behandlung der Zelllinien mit Pio- und Troglitazon zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition (50). Ähnliche Effekte traten auch in PPAR $\gamma$  negativen basophilen Leukämiezellen auf (46). Shiau et al. behandelten Prostatakarzinomzellen mit TZDs und TZD Derivaten ohne PPAR $\gamma$  Bindungsaktivität. Sowohl Troglitazon und Ciglitazon als auch ihre PPAR $\gamma$  inaktiven Derivate inhibierten die Funktion von Bcl<sub>2</sub> und Bcl<sub>xl</sub> und induzierten somit Apoptose, während weder Pio- und Rosiglitazon noch ihre PPAR $\gamma$  inaktiven Varianten eine wesentliche Veränderung in der Apoptoserate bewirkten (51). Da Troglitazon die Chromanstruktur und somit auch die antioxidative Wirkung von

Vitamin E besitzt, könnten die antineoplastischen Effekte von Troglitazon unabhängig vom PPAR $\gamma$  Rezeptor über eine Mimikry der Vitamin E Effekte bewirkt werden (49, 52).

Neben der dosisabhängigen Hemmung der Zellproliferation sind auch Mechanismen wie die Induktion von Apoptose oder Zellzyklusarrest in die antineoplastischen Effekte der Glitazone involviert (53). PPAR $\gamma$  Agonisten verschieben in vielen Tumoren das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen. Über die Hochregulation proapoptotischer Proteine wie BAD und BAX und die daraus resultierenden Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien werden Effektor-Caspasen aktiviert und somit Apoptose induziert (54, 55). Auch andere Apoptosemechanismen wie z.B. die Herunterregulation des der anti-apoptotischen Proteine Bcl<sub>2</sub> und Bcl<sub>xl</sub> scheinen durch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  beeinflusst zu werden (30, 56). Neben der Induktion von Apoptose führen Glitazone in einigen Tumorzellen zu einem Arrest in der G<sub>0/1</sub> Phase des Zellzyklus (53, 56-58). Hierbei sind Mechanismen wie die Herunterregulation von Cyclinen und cyclin depending kinases (CDKs) sowie die Hochregulation der CDK Inhibitoren p18, p21 und p27 beteiligt (29, 56, 59-61).

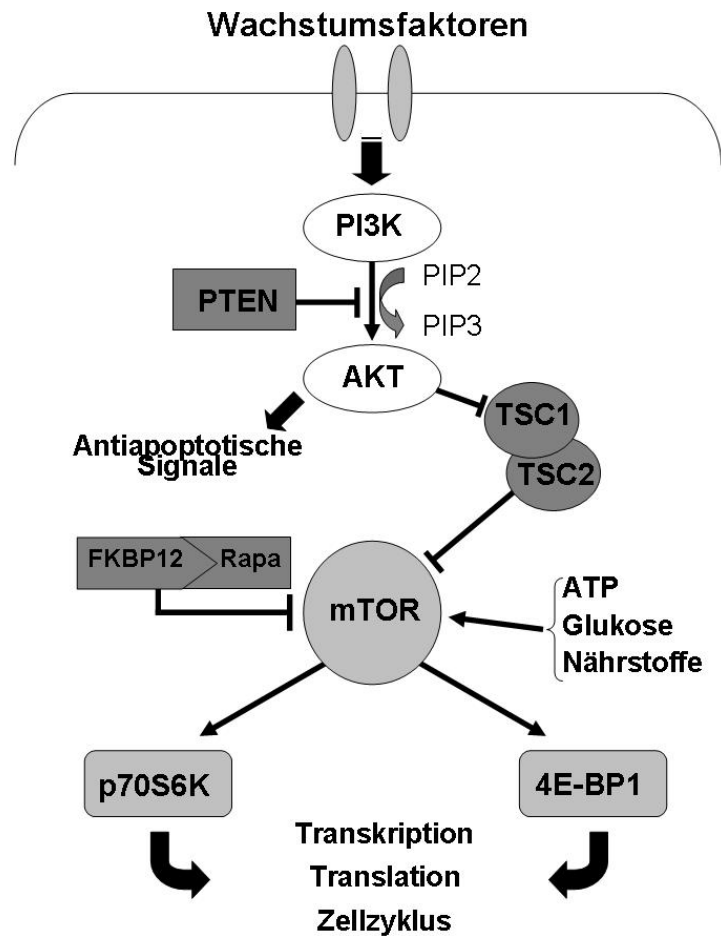
Aktivierung von PPAR $\gamma$  führt auch in Malignomen zur Veränderung der Genexpression. So wird eine Redifferenzierung der entarteten Tumorzellen möglich, was in der Regel mit einer benigneren Verlaufsform der Krankheit verbunden ist. Eine Behandlung mit PPAR $\gamma$  Agonisten führte im Schilddrüsenkarzinom (62), Melanom (45), Liposarkom (63) und in promyeloischen Leukämiezellen (39) zur Reexpression von Differenzierungsmarkern. Im Falle des Liposarkoms sind die Ergebnisse nicht auf *in vitro* Daten beschränkt. In einer klinischen Studie führte eine Therapie mit Troglitazon bei drei Patienten mit hochgradigem Liposarkom zu einer histologischen und biochemischen Differenzierung des Karzinoms (64). Aufgrund der beschriebenen Mechanismen stellt eine Therapie mit PPAR $\gamma$  Agonisten einen viel versprechenden Ansatz in der palliativen Tumorthherapie dar.

## 5.2 mTOR Antagonisten

### 5.2.1 Der mTOR Rezeptor und seine Antagonisten

Der erste mTOR Antagonist, Rapamycin (Sirolimus), wurde 1975 von Vezina et al. aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert (65). Da dieses natürliche Fungizid neben antimikrobiellen Effekten auch immunsuppressive Eigenschaften besitzt, wird Rapamycin in der Transplantationsmedizin eingesetzt um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Obwohl schon während der präklinischen Evaluation gezeigt wurde, dass Rapamycin zusätzlich ein starkes antitumorales Potential besitzt (4, 66), konnten diese Anti-Tumor Effekte zu dieser Zeit aufgrund der chemischen Instabilität und der geringen Wasserlöslichkeit von Rapamycin noch nicht klinisch eingesetzt werden. Erst durch die Entwicklung von Rapamycin-Analoga mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften wie RAD001, CCI-779 und AP23573 wurden die mTOR Antagonisten auch für die Anwendung am Patienten interessant (67).

In einem Komplex mit dem Immunophilin FKBP12 bindet Rapamycin an den mTOR Rezeptor und inhibiert dessen Kinaseaktivität. Der mTOR Rezeptor ist eine atypische Serin-Threonin-Kinase, die in der Regulation von Wachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben der Zelle eine zentrale Rolle spielt. Über die Phosphorylierung seiner 2 wichtigsten Downstream-Effektoren p70S6K1 und 4E-BP1 reguliert mTOR die Translation. Darüber hinaus ist mTOR in die Regulation von Cyclinen, CDKs, CDK Inhibitoren, RNA Polymerasen I/II/III, CLIP-170, VEGF und HIF1 $\alpha$  involviert (5). Die Modulation der mTOR Aktivität erfolgt durch das Angebot an ATP, Glukose und Aminosäuren sowie durch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Abb. 5.2 stellt den IGFR-PI3K-AKT-mTOR Signalweg dar, eine Kaskade von Proteinkinasen, über die die Wachstumsfaktor-induzierte mTOR Aktivierung vermittelt wird. PTEN und TSC1/2 sind negative Regulatoren der mTOR Aktivität. Durch das Tumorsuppressorgen PTEN wird die Konzentration an PIP<sub>3</sub> verringert und somit die Aktivierung von AKT verhindert (68). Der TSC1/2 Komplex dient als direkter Repressor der mTOR Funktion. Eine Phosphorylierung von TSC2 durch AKT destabilisiert diesen Komplex und hebt somit die hemmende Wirkung auf mTOR auf (69).



**Abbildung 5.2 Der mTOR Signalweg.** Abkürzungen: PI3K= phosphatidyl-inositol 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10; TSC= tuberous sclerosis complex; mTOR= mammalian target of rapamycin; FKBP12= FK506 binding protein 12; 4E-BP1= eIF4E-binding protein 1; p70S6K= protein p70 S6 Kinase

### 5.2.2 Direkte antitumorale Effekte der mTOR Antagonisten

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Rapamycin auf Zellproliferation, Apoptose und Zellzyklus von Melanom- und Angiosarkomzellen untersucht. Eine 48-stündige Inkubation mit Rapamycin führte in allen Zelllinien zu einer dosisabhängigen Wachstumsinhibition, wobei die für den alamarBlue<sup>TM</sup> und BrdU Test eingesetzten Konzentrationen gerade bei den Angiosarkomzellen stark voneinander abwichen. Durch 1  $\mu$ M Rapamycin wurde die Zellproliferation in ASM und Iso Has Angiosarkomzellen im alamarBlue<sup>TM</sup> Test um 46%  $\pm$  10% bzw. 29%  $\pm$  7% reduziert, während bei derselben Konzentration im BrdU Test keine proliferierenden Zellen mehr nachweisbar waren. Beim Vergleich der durch alamarBlue<sup>TM</sup> und BrdU Test gewonnenen Ergebnisse muss beachtet werden, dass die Zugabe von alamarBlue<sup>TM</sup> und BrdU zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt. Der alamarBlue<sup>TM</sup> Farbstoff wird schon zu Versuchsbeginn zugegeben, also zu einem

Zeitpunkt, an dem die Zellen noch sehr stoffwechselaktiv sind, wogegen die Zugabe des BrdU erst nach 36 erfolgt. Zusätzlich basieren die beiden Tests auf unterschiedlichen Testmethoden. Der alamarBlue<sup>TM</sup> Farbstoff unterbricht als artifizieller Elektronenakzeptor die Atmungskette und ist somit ein Maß für die metabolische Aktivität der Zelle. Da das Pyrimidin-Analogon BrdU an Stelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird kann mit Hilfe des BrdU Tests die Proliferationsrate der Zellen direkt bestimmt werden. Durch diese methodischen Unterschiede können die Abweichungen in den effektiven Rapamycindosen erklärt werden.

Die beiden humanen Angiosarkomzelllinien ASM und Iso Has schienen sensibler auf die Behandlung mit Rapamycin zu reagieren als die Melanomzelllinien und die murinphänotypische Angiosarkomzelllinie ISOS 1. Während 0,2µM Rapamycin in ASM und Iso Has Angiosarkomzellen das Zellwachstum um  $55\% \pm 10\%$  und  $82\% \pm 11\%$  hemmte, waren die Effekte auf ISOS 1 Angiosarkomzellen, A375 und Mel Ho Melanomzellen mit einer Wachstumsinhibition von  $19\% \pm 14\%$ ,  $25\% \pm 6\%$  und  $21\% \pm 5\%$  geringer ausgeprägt. Die antiproliferativen Effekte von Rapamycin auf Melanom- und Angiosarkomzellen können jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da das Kulturmedium der Melanomzellen 10% FKS, das der Angiosarkomzellen jedoch nur 5% FKS enthielt und Rapamycin zu 92% an Plasmaproteine gebunden ist (siehe unten). Auch in anderen präklinischen Studien wirksamen Rapamycinkonzentrationen variieren stark voneinander. Während in einigen Tumorentitäten schon in nanomolaren Bereich beeindruckende antiproliferative Effekte beschreiben wurden (70, 71), konnten vergleichbare Effekte in Ovarialkarzinomzellen erst im mikromolaren Bereich erreicht werden (72). Es wird postuliert, dass die Wirksamkeit der mTOR Antagonisten vom PTEN Status der Tumorzellen abhängig ist. In einer Vielzahl von Tumoren konnte eine Inaktivierung von PTEN durch Mutation, Deletion, Loss of heterozygosis oder Methylierung nachgewiesen (73-79). Der Verlust der PTEN Funktion führt über eine gesteigerte mTOR Aktivität zu einer Reihe von intrazellulären Anomalien wie aberrante Signaltransduktion, Dysregulation der Apoptose und Alteration in der Zellzyklusprogression. Für die Tumorthapie mit Rapamycin-Analoga könnten PTEN Mutationen jedoch von Vorteil sein, da neben der mTOR Aktivität auch die Empfindlichkeit gegenüber mTOR Antagonisten gesteigert wird. PTEN defiziente Mammakarzinomzellen reagierten sensibler auf die antiproliferativen Effekte von Rapamycin als PTEN positive Kontrollzellen (80). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie in der PTEN-defiziente Tumoren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöh-

te Sensitivität gegenüber dem Rapamycin-Analogon CCI-779 aufwiesen (81). In Endometriumkarzinomzellen schienen die antineoplastischen Effekte von Rapamycin jedoch nicht vom PTEN Status der Zellen abzuhängen (70).

Der Verlust der PTEN Funktion ist ein später Schritt in der Melanomentstehung. Während nur in 10% der primären Melanome PTEN Alterationen nachgewiesen wurden, liegt die PTEN Mutationsrate in Melanomzelllinien bei 20-50% (82-86). In A375 Melanomzellen ist PTEN nicht alteriert (83). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass für diese spezielle Zelllinie eine Wachstumsinhibition erst bei sehr hohen Konzentrationen an Rapamycin erreicht werden konnte. Der PTEN Status der Mel Ho Melanomzellen wurde bislang nicht untersucht. Mit der Frage, ob Angiosarkome PTEN Mutationen aufweisen, haben sich bislang zwei Arbeitsgruppen beschäftigt. Im caninen Hämangiosarkom konnte eine somatische Punktmutation oder Deletion an der C-terminalen Domäne von PTEN nachgewiesen werden (87), im humanen hepatischen Angiosarkom führte eine die Substitution einer Base im Exon 7 zu einer Nonsense-Mutation im PTEN Gen (88).

In zahlreichen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass mTOR Antagonisten zu einem Arrest der Zellen in der G<sub>0/1</sub> Phase des Zellzyklus führen (71, 89-91). Hierbei sind Mechanismen wie die Herunterregulation von Cyclin A und D<sub>1</sub> sowie CDK 4 und eine Steigerung der Expression von p21 und p27 involviert (72, 92, 93). In dieser Arbeit wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Rapamycin in A375, nicht aber in Mel Ho Melanomzellen ein Arrest der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus beobachtet, gleichzeitig verringerte sich der Anteil der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Zusätzlich konnte Melanomzellen und in ISOS 1 Angiosarkomzellen ein diskreter Anstieg in der Apoptoserate gezeigt werden, der jedoch nicht für alle Zelllinien statistische Signifikanz erreichte. Inwieweit mTOR Antagonisten proapoptotische Effekte besitzen, wird derzeit kontrovers diskutiert. Huang et al. postulierten, dass normale Zellen auf Inkubation mit Rapamycin mit Zellzyklusarrest und Zytostase antworten, während in p53 defizienten Tumorzellen Apoptose induziert wird (94). So blockierte Rapamycin im Nierenzell-, Endometrium-, und Bronchialkarzinom die Zellzyklusprogression ohne Apoptose zu induzieren (70, 90, 95). Im Gegensatz dazu vermuteten Hosoi und Kollegen, dass die Steigerung der Apoptoserate unter serumfreien Bedingungen vom p53 Status der Zelle unabhängig ist (91). Einige Arbeitsgruppen beschreiben eine Korrelation zwischen gesteigerter Bcl<sub>2</sub> Expression oder AKT Aktivierung in Tumorzellen und Schutz vor Rapamycin-induzierter A-



poptose (72, 92, 96). Im Gegensatz dazu wurde die Steigerung der Apoptoserate im anaplastischen großzelligen Lymphom von einer Reduktion der antiapoptotischen Faktoren Bcl<sub>2</sub>, Bcl<sub>xl</sub> und c-FLIP begleitet (93). Auch im Neuroblastom sowie im neuroendokrinen Tumor des Pankreas führte die Behandlung mit mTOR Antagonisten zu einer Induktion der Apoptose (89, 97). Durch eine Kombination von Rapamycin oder Analoga mit zytotoxischen Substanzen konnte in einigen Tumoren die Apoptoserate gesteigert werden. So sensibilisierten Rapamycin oder RAD001 verschiedene Tumorzellen für die zytolytischen Effekte von Doxorubicin (98), Vinblastin (99), Cisplatin (100) oder ACNU (101). In anderen Studien schien die Inaktivierung von mTOR jedoch die proapoptotischen Effekten einiger Substanzen zu antagonisieren. Rapamycin schützte vor der Apoptose-Induktion durch PS-341 in multiplen Myelom (96) und im B-Zelllymphom wurden die Effekte von Etoposid und Paclitaxel abgeschwächt, während die Apoptose durch Doxorubicin nicht beeinflusst wurde (92). Ob mTOR Antagonisten die proapoptotische Wirkung anderer Substanzen unterstützen oder eher behindern scheint einerseits von der Medikamentenkombination, andererseits von der jeweiligen Tumorentität abhängig zu sein. So führte in dieser Arbeit eine Kombination aus Rapamycin und Celecoxib in beiden untersuchten Melanomzelllinien zu einer zwar geringen, aber signifikanten Reduktion der Apoptoserate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während dieselbe Kombination in ISOS 1 Angiosarkomzellen die Apoptose genauso stark induzierte wie Celecoxib allein. Aus diesem Grund bedarf es weiterer präklinischer Studien, um für die jeweilige Tumorentität geeignete Medikamentenkombinationen festzulegen.

## 5.3 COX 2 Inhibitoren

### 5.3.1 COX 2 und ihre Funktion

Die Cyclooxygenase (COX) ist ein membrangebundenes Enzym, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine katalysiert. Bislang wurden 3 Isoformen der COX identifiziert. Die COX 1 ist in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und katalysiert die Prostaglandinsynthese unter physiologischen Bedingungen wie z.B. zur Induktion der Thrombozytenaggregation und zum Zellschutz im Gastrointestinaltrakt. Die COX 2 spielt vor allem bei Entzündungsreaktionen, Gewebsschädigungen und Schmerzreaktionen eine entscheidende Rolle. Als *intermediate early response gene* kann die Expression der COX 2 durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und Hypoxie schnell induziert werden. In einigen Geweben wie im Uterus, ZNS und Niere ist die COX 2 konstitutiv exprimiert und übernimmt dort auch physiologische Funktionen wie Nidation, Kontrolle der Körpertemperatur und Regulation des Natriumhaushaltes (7, 102). Ob die COX 3, eine Splice Variante der COX 1, im menschlichen Gewebe exprimiert ist, wird derzeit noch diskutiert (103). Nach der Entdeckung der COX 2 1991 wurden selektive COX 2 Inhibitoren entwickelt. Diese neuen Substanzen sollten dieselbe analgetische, antipyretische und antiinflammatorische Wirkung entfalten wie herkömmliche nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) ohne deren antithrombozytäre und gastrointestinale Nebenwirkungen hervorzurufen (104). Nachdem jedoch gezeigt wurde, dass eine langfristige Einnahme (> 18 Monate) von Rofecoxib (Vioxx) das Risiko kardiovaskulärer Komplikationen erhöht, wurde dieses Medikament 2004 vom Markt genommen. Aufgrund lebensbedrohlicher Hautreaktionen und unzureichender Daten über die kardiovaskuläre Sicherheit erfolgte 2005 auch die Marktrücknahme von Valdecoxib (105), die Indikationen für Celecoxib wurden massiv eingeschränkt. In der palliativen Tumorthherapie bergen COX 2 Hemmer aber trotz allem weiterhin ein interessantes Potential, das in präklinischen und klinischen Studien weiter untersucht werden sollte.

### **5.3.2 Rolle der COX 2 im Tumor**

Die COX 2 ist über mehrere Mechanismen an der Tumorentstehung beteiligt und fördert die Tumorzellinvasion und Metastasierung. In einer Reihe von humanen Tumoren wie Kolon-, Zervix-, Pankreas-, Brust-, und Magenkarzinomen konnte eine Überexpression der COX 2 nachgewiesen werden (106-110). In dieser Arbeit konnte in allen sechs untersuchten Melanomzelllinien COX 2 RNA detektiert werden, wobei die Höhe der COX 2 Expression zwischen den Zelllinien stark variierte. Die Bedeutung der COX 2 Expression im Melanom wird kontrovers diskutiert. Vogt et al. konnten weder in benignen noch in malignen melanozytären Läsionen immunhistochemisch COX 2 nachweisen (111). Diese Ergebnisse werden von Goulet et al. teilweise bestätigt, die COX 2 zwar in Lymphknotenmetastasen und Melanomzelllinien, nicht aber im primären Melanom und benignen Nävus fand (112). Andere Arbeitsgruppen beschreiben COX 2 Expression im Melanom (113) und empfehlen sogar COX 2 als immunhistochemischen Marker zur Abgrenzung der Melanome von benignen melanozytären Läsionen (114).

### **5.3.3 Direkte antitumorale Effekte der COX 2 Inhibitoren**

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Celecoxib auf Wachstum, Apoptose und Zellzyklusverteilung von Melanomzellen untersucht werden. Eine 48-stündige Inkubation mit 10 – 100µM Celecoxib verursachte in beiden Zelllinien eine dosisabhängige Inhibition der Zellproliferation. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von Chiu et al. überein, die die Wirkung verschiedener NSAR auf A375 Melanomzelle untersuchte und durch Celecoxib und Indomethacin, nicht aber durch Aspirin oder Piroxicam zytostatische Effekte bei geringer Toxizität beobachtete (115). Auch im humanen Cholangio- und hepatozellulären Karzinom bewirkten vergleichbare Konzentrationen an Celecoxib eine Reduktion des Zellwachstums (116, 117), während Prostatakarzinom schon 1-10µM Celecoxib bedeutende antiproliferative Effekte verursachten (118).

In vielen Tumoren scheint eine positive Korrelation zwischen COX 2 Überexpression und Resistenz gegen den programmierten Zelltod zu existieren. Durch die Behandlung mit COX 2 Inhibitoren kann diese Resistenz überwunden werden und das sensible Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen wieder in Richtung der Apoptose verschoben zu werden. So führte die Inkubation mit 50µM bzw. 20µM Celecoxib sowohl in den beiden untersuchten Melanomzelllinien als auch in der Angiosarkomzelllinie ISOS 1 zu einer Steigerung der Caspase 3 und 7 Aktivität. Einige Mechanismen, die der Coxib-induzierten Apoptose zugrunde liegen, konnten inzwischen iden-

tifiziert werden. In einigen Tumorzellen wurde eine Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs durch die Induktion der proapoptotischen Faktoren BAD, BAX und BID und die Reduktion der antiapoptotischen Faktoren Bcl<sub>2</sub> und Bcl<sub>xl</sub> beobachtet (119-122). Die Veränderung der Bcl<sub>2</sub>/ BAX Ratio führt über die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom C und dadurch zur Aktivierung der Caspase 9 und anderer Effektorcaspasen wie Caspase 3. In anderen Studien wurde die Aktivierung des Todesrezeptor-Signalwegs für die Celecoxib-induzierte Apoptose verantwortlich gemacht (123, 124). Die Ergebnisse einer Studie mit Ovarialkarzinomzellen deuten darauf hin, dass Celecoxib die Apoptose in Abhängigkeit des p53 Status der Zelle entweder über den Todesrezeptor- oder den mitochondrialen Signalweg induziert (125).

Ein weiterer antineoplastischer Effekt, der in vielen Tumorentitäten beobachtet werden konnte, ist der Arrest in der G<sub>0</sub>/ G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus. Hierfür werden Mechanismen wie die Hochregulation der CDK Inhibitoren p21 und p27, die Herabregulation der Cycline A, B und D<sub>1</sub> und der CDKs sowie eine Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins verantwortlich gemacht (116, 126-128). In den beiden Melanomzelllinien A375 und Mel Ho konnte nach 24-stündiger Inkubation mit 50µM Celecoxib keine Veränderung in der Zellzyklusverteilung festgestellt werden.

#### **5.3.4 COX2 unabhängige Effekte der COX 2 Inhibitoren**

Um zu bestimmen, ob die durch Celecoxib ausgelösten antineoplastischen Effekte vom COX 2 Status der Zellen abhängig sind, wurde eine Zelllinie mit hoher COX 2 Expression (A375) und eine mit geringer COX 2 Expression (Mel Ho) für die Versuche ausgewählt. Die antiproliferativen Effekte von Celecoxib waren trotz des unterschiedlichen COX 2 Expressionslevels in beiden Melanomzelllinien vergleichbar. Die Steigerung der Caspase 3 und 7 Aktivität war sogar in Mel Ho Melanomzellen stärker ausgeprägt als in A375 Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einige antitumoralen Effekte von Celecoxib in Melanomzellen nicht von der COX 2 Expression abhängen. Auch Williams et al. beschrieben vergleichbare Effekte von Celecoxib auf COX 2 (+/+), COX 2 (+/-) und COX 2 (-/-) Fibroblasten und postulierten, dass die antitumoralen Effekte von Celecoxib nicht durch die Hemmung der COX 2 vermittelt wird (129). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen die Wirkung von Coxib in COX 2 negativen Tumorzellen (111, 118, 128, 130-132) und Zellen mit geringer COX 2 Expression (117) untersucht wurde. Auch durch die Ausschaltung der COX 2

Aktivität mittels *antisense depletion* (116) und die Verwendung eines Celecoxib-Analogons ohne COX 2 Inhibitionskapazität (133) konnte die Hypothese bestätigt werden, dass einige der antineoplastischen Effekte der Coxibe auch über COX 2 unabhängige Signalwege vermittelt werden. Zusätzlich wird berichtet dass die Konzentrationen, in denen NSARs ihre antineoplastischen Effekte entfalten, 100-1000-fach höher sind als für die Inhibition der COX 2 Aktivität oder der Prostaglandinsynthese (134).

#### **5.4 Effektive Medikamentenkonzentrationen *in vitro* und *in vivo***

In dieser Arbeit wurden 10-100µM Celecoxib und Pioglitazon und 0,025 -1µM Rapamycin eingesetzt. Auch für andere Tumorentitäten konnte bei diesen Medikamentenkonzentrationen *in vitro* antineoplastische Effekte nachgewiesen werden (72, 116, 128, 130). Beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener präklinischer Studien, in denen die antitumoralen Wirkungen von Celecoxib, Rapamycin oder Pioglitazon untersucht wurden, fällt auf, dass die effektiven Medikamentendosen je nach Zelllinie stark variieren. Auch innerhalb einer Zelllinie unterscheiden sich die benötigten Konzentrationen zur Inhibition des Zellwachstums und Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest zum Teil beträchtlich. In humanen Cholangiokarzinomzellen arretierten 50µM Celecoxib die Zellen in der G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus (116), in Blasenkarzinomzellen traten sowohl Apoptose als auch Zellzyklusarrest erst bei 100µM auf (130). Während im Prostatakarzinom schon 15µM Celecoxib zu Veränderungen in der Zellzyklusverteilung führten, konnte die Apoptose erst ab 50µM induziert werden (133). Ein wichtiger Aspekt, der beim Vergleich der *in vitro* Daten berücksichtigt werden muss ist die Tatsache, dass alle drei verwendeten Substanzen eine hohe Plasmaproteinbindung aufweisen (Rapamycin 92%, Celecoxib 97%, Pioglitazon 99%)(6, 9, 26). In präklinischen Studien wurden diese Medikamente entweder in normalem Kulturmedium (meist mit 10% FKS) (116, 118, 131, 135), serumreduziertem (129, 136, 137) oder serumfreiem Kulturmedium (49, 51, 91, 132, 138) gelöst. Um zu bestimmen, ob der Grad der Plasmaproteinbindung Einfluss auf die antiproliferative Wirkung der Medikamente hat, wurden in dieser Arbeit einige Wachstumsversuch auch unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. In den untersuchten Melanomzellen konnte schon bei 40µM Celecoxib eine starke dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums beobachtet werden, vergleichbare Effekte traten unter Standardbedingungen erst bei 80µM auf. Somit konnte gezeigt werden, dass der Serumgehalt im Zellkulturmedium direkten Einfluss auf die Wirksamkeit von Celecoxib hat. Je niedriger der FKS Gehalt, desto höher ist der Anteil an ungebundenem, also wirksa-

men Medikament. Eine Inkubation der Melanomzellen mit Rapamycin führte unter serumfreien Bedingungen nur zu einer geringen Wachstumsinhibition, in Iso Has Angiosarkomzellen wurde das Zellwachstum bei allen Konzentrationen um ca. 40% gehemmt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Zellproliferation durch Rapamycin unter serumfreien Bedingungen nicht stärker ausgeprägt ist als unter Standardbedingungen und zudem nicht dosisabhängig ist. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die Aktivität des mTOR Rezeptors über die Konzentration von Aminosäuren, Glucose und ATP reguliert wird. Während eine hohe Konzentration an Nährstoffen die mTOR Expression positiv beeinflusst, führt der Hungerstoffwechsel der Zelle zu einer Abnahme der mTOR Funktion (139). Dadurch könnten auch die antineoplastischen Effekte der mTOR Antagonisten reduziert werden.

Da *in vivo* keine serumfreien Bedingungen erreicht werden können, wurden in dieser Arbeit alle Tests, mit Ausnahme des tubular formation assays, unter Standardbedingungen mit 10% bzw. 5% FKS durchgeführt. Die *in vitro* eingesetzten Medikamentenkonzentrationen scheinen jedoch *in vivo* nicht erreichbar zu sein. In Kolonkarzinomzellen wurde durch 20µM bzw. 50µM Celecoxib *in vitro* Apoptose und Zellzyklusarrest induziert. Obwohl der *in vivo* bestimmte Celecoxib-Serumspiegel mit ~ 2,3µM deutlich unter den *in vitro* eingesetzten Konzentrationen lag, wurde das Tumorwachstum in Tiermodell effektiv gehemmt (129). In klinischen Studien wird Celecoxib meist mit anderen biomodulierenden oder zytostatischen Medikamenten kombiniert. Die verabreichten Celecoxib-Dosen variieren hierbei zwischen 100mg und 600mg zweimal täglich. Die Celecoxib-Plasmaspiegel von Patientinnen mit Cervixkarzinom, die im Rahmen einer Pilotstudie über 10 Tage zweimal täglich 400mg Celecoxib einnahmen, lag an allen Messzeitpunkten unter 5µM/l (140). Auch Rapamycin entfaltete seine direkten antineoplastischen Effekte *in vitro* erst bei einer Konzentration von 1µg/ml ( $\approx$  1µM), während *in vivo* Spitzenspiegel von 0,8µg/ml und Talspiegel von 0,04µg/ml erreicht wurden (141). Zur Immunsuppression nach Organtransplantation liegt der Zielspiegel für Rapamycin im Vollblut bei 6- 15 ng/ml ( $\approx$  6-15 nM) (142).

Obwohl die klinisch erreichbaren Medikamentenspiegel weit unter den *in vitro* bestimmten Konzentrationen liegen, zeigen erste klinische Studien mit Celecoxib, Pioglitazon und Rapamycin ermutigende Ergebnisse. Tabelle 5.1 fasst die Daten einiger klinischer Studien zusammen in denen die Medikamente als Einzelsubstanzen oder in Kombination mit anderen biomodulatorischen oder zytostatischen Medikamenten verabreicht wurden.

<b>Tumor</b>	<b>Medikamente</b>	<b>Klinische Studie</b>	<b>Ergebnis</b>	<b>Zitat</b>
<b>Angiosarkom</b>	Pioglitazon, Rofecoxib Trofosfamid (metronom)	Pilotstudie (n=6)	2 x KR 1x PR 3x S	Vogt, 2003 (143)
<b>Bronchialkarzinom</b>	Gefitinib Celecoxib	Phase II (n=27)	7% RR	Gadgeel, 2007 (144)
<b>Bronchialkarzinom</b>	Everolimus Gefitinib	Phase I (n=10)	2x PR	Milton, 2007 (145)
<b>Bronchialkarzinom</b>	Celexocib, Paclitaxel, Carboplatin	Phase II (n=29)	17% KR 48% PR	Altorki, 2003 (146)
<b>Glioblastoma multi- forme</b>	13 Cis Retinolsäure, Celecoxib	Phase II (n= 25)	44% S	Levin, 2005 (147)
<b>Kaposi-Sarkom</b>	Pioglitazon, Rofecoxib Trofosfamid (metro- nom)	Fallbericht (n=1)	Stabile Re- mission > 1 Jahr	Coras, 2004 (148)
<b>Kaposi-Sarkom</b>	Rapamycin	(n=15)	15x Remis- sion	Stallone, 2005 (149)
<b>Kolorektales Karzi- nom</b>	5-FU, Leucovorin, Ro- fecoxib	Phase II (n=10)	Kein Effekt	Becerra, 2003 (150)
<b>Liposarkom</b>	Rosiglitazon	Phase II (n=12)	Kein Effekt	Debrock, 2003 (151)
<b>Malignes Gliom</b>	Irinotecan Celecoxib	Phase II (n=37)	16% AR 35% S	Reardon, 2005 (152)
<b>Mammakarzinom</b>	Celecoxib, Trastuzu- mab	Phase II (n=12)	Kein Effekt	Dang, 2004 (153)
<b>Melanom</b>	Pioglitazon, Rofecoxib Trofosfamid (metro- nom)	Phase II (n=19)	19% AR 14% S	Reichle, 2004 (154)
<b>Melanom</b>	Treosulfan (metronom) Rofecoxib	Pilotstudie (n=12)	1x PR 4 x S	Spieth, 2003 (155)
<b>Melanom</b>	Temozolomid Celecoxib	Phase II (n=50)	5x KR, 6x PR 20x S	Gogas, 2006 (156)
<b>Melanom</b>	CCI-779	Phase II (n=33)	1xPR	Margolin, 2005 (157)
<b>Multiples Myelom</b>	Thalidomid, Celecoxib	Phase II (n= 66)	42 % AR	Prince, 2005 (158)
<b>Nierenzellkarzinom</b>	Temsirolimus Interferon $\alpha$	Phase I/II (n=71)	8% PR 36% S	Motzer, 2007 (159)
<b>Non-Hodgkin Lymphom</b>	Cyclophosphamid (metronom) Celecoxib	Phase II (n= 32)	2x KR 9x PR	Buckstein, 2006 (160)
<b>Pankreaskarzinom</b>	Gemcitabin, Celecoxib	PhaseII (n=42)	4x PR 26x S	Ferrari, 2006 (161)
<b>Plattenepithelkarzi- nom</b>	Gefitinib, Celecoxib	Phase I (n= 19)	22% PR	Wirth, 2005 (162)
<b>Weichteilsarkom</b>	Pioglitazon, Rofecoxib Trofosfamid (metronom)	Phase II (n=21)	11% AR 11% S	Reichle, 2004 (154)

**Tabelle 5.1** Klinische Studien mit COX 2 Inhibitoren, PPAR $\gamma$  Agonisten und mTOR Antagonisten als Einzelsubstanzen oder in Kombination mit Chemotherapie oder anderen Biomodularen. KR = komplette Remission, PR= partielle Remission, AR= Ansprechrate, S = Stabilisierung

## 5.5 Stromaorientierte Tumorthherapie

### 5.5.1 Grundlagen der Stromaorientierten Tumorthherapie

Die Unterschiede in den effektiven Medikamentenkonzentrationen *in vitro* und *in vivo* lassen sich eventuell dadurch erklären, dass Rapamycin, Celecoxib und Pioglitazon ihr antineoplastisches Potential nicht nur über die Induktion der Apoptose und Inhibition des Zellwachstums in Tumorzellen entfalten. Über diese direkten Effekte auf die Tumorzellen hinaus konnten für diese Substanzgruppen auch eine Modulation des peritumoralen *Stromas* im Sinne von immunaugmentierenden und antiangiogenetischen Effekten nachgewiesen werden. Zwischen Tumor und dem umgebenden Stroma besteht eine für das Tumorwachstum essentielle Wechselbeziehung. Malignome sind in der Lage das umgebende Gewebe so zu verändern, dass ein für Tumorwachstum, Tumoringression und gegebenenfalls für eine spätere Metastasierung günstiges Milieu entsteht (10). Am Austausch zwischen Tumor und Stroma sind unter anderem Wachstumsfaktoren, Proteine der extrazellulären Matrix, Proteinasen und Zytokine beteiligt. Durch einen Angriff auf peritumorale Zellen wie Fibroblasten, immunologisch aktive Zellen und insbesondere Endothelzellen des Tumorgefäßbettes kann diese Tumor-Stroma-Interaktion gestört werden. Ein Vorteil dieser Therapiestrategie liegt darin, dass die Stromazellen im Gegensatz zu den Tumorzellen genetisch nicht alteriert sind und somit die Entwicklung chemoresistenter Zellklone verzögert oder ganz verhindert werden kann. Da sich das peritumorale Stroma durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle von normalen Körperzellen unterscheidet, scheint ein selektiver Angriff auf das Tumorstroma möglich zu sein. Zusätzlich werden bei stromaorientierten Ansätzen im Vergleich zur konventionellen Tumorthherapie niedrigere Medikamentendosen benötigt, was zu einem günstigeren Nebenwirkungsprofil und somit auch, gerade bei oral-ambulantem Procedere, zu einer Verbesserung der Lebensqualität führt. Wichtig ist, dass das Ziel der stromaorientierten Tumorthherapie nicht darin besteht eine hohe Ansprechrate zu erreichen und dafür hohe Nebenwirkungen in Kauf zu nehmen. Vielmehr soll die Erkrankung stabilisiert und das progressionsfreie Überleben verlängert werden.

Die Wirkmechanismen der stromaorientierten Tumorthherapie werden derzeit in zahlreichen klinischen und präklinischen Studien intensiv untersucht, einige davon konnten mittlerweile identifiziert werden. PPAR $\gamma$  Liganden besitzen durch die Rekrutierung natürlicher Killer T (NKT) Zellen und die Induktion der Reifung von dendritischen Zellen immuno-augmentierende Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$



Aktivierung die Expression von Differenzierungsmarkern wie CD14 und CD36 in Makrophagen erhöht und die PPAR $\gamma$  Expression mit dem Grad der Reifung von Makrophagen und Monozyten steigt (163). Zusätzlich ist PPAR $\gamma$  auch in die Entwicklung eines Subtyps von dendritischen Zellen involviert, dessen Kapazität zur Internalisierung von Tumorantigenen gesteigert ist und der ein erhöhtes Potential zur Aktivierung invarianter NKT Zellen besitzt (164). Neben PPAR $\gamma$  spielt auch die COX 2 in der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle. COX 2 Überexpression in Tumorzellen beeinträchtigt über die verstärkte Produktion von PGE<sub>2</sub> die Antigenpräsentation durch dendritischen Zellen sowie die T-Zell-Proliferation (165). Über eine Hemmung dieser Effekte fördern COX 2 Inhibitoren somit trotz ihres antiinflammatorischen Wirkprofils die Anti-Tumor-Aktivität des Immunsystems. Hierbei ist z.B. die durch Modulation der NK-Aktivität hervorgerufene Erkennung und Lyse metastasierter Tumorzellen (166) und die Veränderung der Balance zwischen IL-10 und IL-12 involviert (167).

Ein entscheidender Mechanismus bei der Tumordinvasion und Metastasierung ist die proteolytische Matrixdegradierung durch Gelatinasen und Teile des Plasminogenaktivierungssystems. Durch Behandlung mit PPAR $\gamma$  Agonisten, COX 2 Hemmern und mTOR Antagonisten konnte die gelatinolytische Aktivität der Matrixmetalloproteinasen 2, 7 und 9 reduziert werden, was mit einer Inhibition der Zellinvasion verbunden war (49, 57, 168-172). Zusätzlich wurde auch eine Hemmung der Zellmigration (173-175) und eine Inhibition der Metastasierung durch Rapamycin im Tiermodell gezeigt (90, 95).

### **5.5.2 *Antiangiogenetische Therapie***

Den wahrscheinlich wichtigsten Angriffspunkt der stromaorientierten Therapie stellen die Endothelzellen im Tumorgefäßbett dar. Ab einer Größe von 100 – 200 $\mu$ m ist sowohl die Versorgung eines Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff als auch die Elimination toxischer Metabolite durch Diffusion allein nicht mehr gewährleistet (176, 177). Aus diesem Grund sind Malignome in der Lage, das sensible Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren zu verschieben und sich durch die Ausbildung eines tumoreigenen Gefäßnetzwerks die Voraussetzungen für ein exponentielles Wachstum und eine spätere Metastasierung zu verschaffen. Dieser „angiogenetische Switch“ kann durch mechanischen oder metabolischen Stress, Immun- und Entzündungsreaktionen sowie genetische Mutationen getriggert werden (176).

Die tumorale Neoangiogenese ist ein komplexer Vorgang, in den neben der Aussprossung von Gefäßen und Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen auch die intussus-

zeptive Angiogenese, d.h. die Aufteilung eines großen Muttergefäßes in 2 Tochtergefäße, involviert ist (178, 179). Zusätzlich können Tumorzellen an bereits existierenden Gefäßen entlang wachsen ohne eine angiogenetische Reaktion hervorzurufen („vessel co-option“) (180). Ein weiterer Mechanismus der Gefäßneubildung, der vor allem im hochaggressiven und metastasierten Melanom eine bedeutende Rolle spielt, ist die vaskuläre Mimikry (181-183). Hierunter versteht man die Formation flüssigkeitsleitender, gefäßartiger Strukturen durch hochgradig invasive und genetisch dysregulierte Tumorzellen. Dieser Vorgang läuft unabhängig von der Angiogenese ohne Beteiligung von Endothelzellen ab (184). Aufgrund dieser verschiedenen Mechanismen, die an der tumoralen Gefäßbildung beteiligt sind, unterscheiden sich Tumorgefäße in ihrer Architektur grundlegend von gesunden Gefäßen. Die mosaiken Tumorgefäße sind irregulär, heterogen, und porös, die Endothelzellen sind unorganisiert und weisen eine abnorme Expression von Oberflächenmolekülen auf (178, 185-187). Aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen Gefäßen im Tumor und normalen Gewebe ist eine selektive Destruktion des tumorale Gefäßnetzes unter Schonung des übrigen Gewebes denkbar. Hierzu wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl von Angiogenese-Inhibitoren entwickelt wie z.B. kleinmolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren oder neutralisierende Antikörper gegen VEGF und EGFR. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass auch Medikamente wie Rapamycin und Celecoxib oder die metronome, also täglich niedrig dosierte, Gabe von Chemotherapeutika hemmende Einflüsse auf die tumorale Neoangiogenese entfalten.

Die COX 2 fördert die Angiogenese über verschiedene Effektoren. Integrin  $\alpha_5\beta_3$  erleichtert die Migration und das Überleben der Endothelzellen, Matrixmetalloproteinasen sind in die sind in Tumor- und Endothelzellinvasion involviert und EGFR und PGE<sub>2</sub> setzen VEGF direkt aus den Stromazellen frei. Mit Hilfe selektiver COX 2 Inhibitoren können diese proangiogenetischen Mechanismen blockiert und die tumorale Neoangiogenese gehemmt werden. Sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien bewirkte die Hemmung der COX 2 eine Reduktion der Gefäßdichte im Tumor (188-190). Auch die bFGF-induzierte Invasion und Gefäßformation von bovinen Aortenendothelzellen wurde gehemmt. Zusätzlich wird eine Senkung der VEGF Konzentration beschrieben (191). Das VEGF Plasmalevel von Patientinnen mit Mammakarzinom stieg jedoch unter einer längeren Therapie mit Celecoxib an (192). Während gesunde Gefäße nur COX 1, tumorversorgende Gefäße jedoch beide COX Isoformen exprimieren, ist eine selektive antiangiogenetische Tumorthherapie mit COX 2 Inhibitoren denkbar (193).

Ein entscheidender Schritt in der Progression einer avaskulären mikrometastatischen Läsion zu einem makrometastatischen Tumor ist die Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen (194). Eine Inhibition der COX 2 oder mTOR Aktivität in endothelialen Progenitorzellen reduzierte die Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration, Adhäsion und Gefäßformation *in vitro* (195-197). Allerdings führte Celecoxib in Kombination mit metronom applizierter Chemotherapie in einer Phase I Studie bei Patienten mit massiv vorbehandelten soliden Tumoren zu keiner Veränderung der zirkulierenden Endothelzellen oder endothelialen Progenitorzellen (198).

Malignome mit gesteigerter mTOR Aktivität sind sehr gut vaskularisiert (199). Der mTOR Rezeptor scheint in der Hypoxie-induzierten Proliferation von Endothelzellen eine entscheidende Position einzunehmen. HIF1- $\alpha$  akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen und induziert nach einer Heterodimerisierung mit HIF1- $\beta$  die Transkription proangiogenetischer Faktoren wie VEGF und PDGF. Ist mTOR in Tumorzellen überexprimiert, so steigt in diesen Zellen die Konzentration an HIF1 $\alpha$  und somit auch an VEGF. Durch die Blockade der mTOR Aktivität kann dieser Mechanismus unterbrochen und die Neoangiogenese in Malignomen inhibiert werden. In einigen Tumoren wurde durch mTOR Antagonisten sowohl die HIF1 $\alpha$  als auch die VEGF Konzentration gesenkt (100, 199-202). Durch die Hemmung der Gefäßaussprossung *in vitro* und die Reduktion der Gefäßdichte *in vivo* beeinträchtigt Rapamycin auch die VEGF-vermittelte Angiogenese (175, 203-205). Daneben ist Rapamycin in der Lage, die Antwort der Endothelzellen auf die Stimulation mit VEGF zu vermindern, Apoptose von Endothelzellen zu fördern und Thrombosen in tumoralen Gefäßen zu induzieren (141, 206, 207).

In dieser Arbeit wurden die antiangiogenetischen Effekte von Rapamycin und Celecoxib mit Hilfe des tubular formation assays untersucht. Endothelzellen zeigen *in vitro* die Tendenz, spontan gefäßartige Strukturen auszubilden, wenn sie auf geeigneter extrazellulärer Matrix kultiviert werden. Besonders gut eignet sich hierfür die Matrigel<sup>TM</sup> Basement Membrane Matrix, eine lösliche Extrazellulärmatrix, die neben ihrem Hauptbestandteil Laminin zahlreiche Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$  und FGF enthält (23, 208). In einigen präklinischen Studien wurden 24-Well Platten mit 200-350 $\mu$ l flüssigem Matrigel<sup>TM</sup> beschichtet und zur Aushärtung für 30-45min im Brutschrank inkubiert (209-211). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine ungleiche Verteilung des Matrigels<sup>TM</sup> in den Wells zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit spezielle, bereits mit

Matrigel<sup>TM</sup> beschichtete 24-Well Platten verwendet. Interessanterweise konnte die Bildung gefäßartiger Strukturen nur unter serumfreien Bedingungen beobachtet werden. Auch andere Arbeitsgruppen führten den tubular formation assay unter serumreduzierten oder serumfreien Kulturbedingungen durch (141, 200, 212). Zur Auswertung des tubular Formation assays findet man in der Literatur unterschiedlichste Verfahren wie semiquantitative Auswertungen, Berechnung der Gefäßdichte oder Bestimmung der Anzahl, Länge und Weite der Tubuli (141, 213, 214). In dieser Arbeit wurden die Gefäßformationen nach ihrer Morphologie in Kategorien von 0-3 eingeteilt und eine semiquantitative Auswertung durchgeführt.

Sowohl durch 0,1 – 10nM Rapamycin als auch durch 5-25µM Celecoxib konnte die Formation gefäßartiger Strukturen im tubular Formation assay effektiv gehemmt werden. Die im Melanomzellen zur Induktion der Apoptose und Inhibition des Zellwachstums eingesetzten Rapamycinkonzentrationen lagen sowohl unter serumhaltigen als auch serumfreien Bedingungen bei 0,2-1µM. Somit konnte gezeigt werden, dass zur Hemmung der Angiogenese wesentlich geringere Rapamycindosen nötig sind als zur Induktion antiproliferativer und proapoptotischer Effekte. Dieser Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Guba et al. überein, die antiangiogenetische Effekte von Rapamycin schon im nanomolaren Bereich, antitumorale Effekte aber erst bei wesentlich höheren Konzentrationen detektierten (141, 204). Diese Daten ermutigten dazu, die Wirkung von Rapamycin und Celecoxib auf alterierte Endothelzellen zu untersuchen. Hierzu wurden immortalisierte Angiosarkomzellen verwendet.

## 5.6 Das Angiosarkom

Das Angiosarkom ist ein seltener und sehr aggressiver bösartiger Tumor, der von den Endothelzellen der Blutgefäße ausgeht. Angiosarkome manifestieren sich bevorzugt in oberflächlichen Weichteilen, in > 50 % der Fälle am Skalp und im Kopf-Hals Bereich. Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 65-70 Jahren, im Rahmen von vaskulären Fehlbildungen können Angiosarkome jedoch auch im Kinder- oder Adoleszenzalter auftreten (215). In der heutigen Zeit ist das Angiosarkom besonders bei Patientinnen mit Mammakarzinom ein zunehmendes Problem. Sowohl ein persistierendes Lymphödem nach radikaler Mastektomie als auch Bestrahlung nach brusterhaltender Therapie stellen Risikofaktoren für die Entstehung eines Angiosarkoms dar (216).

Da Symptome lange Zeit fehlen und gerade Angiosarkome im Kopf- und Halsbereich anfangs wie inflammatorische Gesichtsdermatosen imponieren, ist eine Diagnose im Frühstadium der Erkrankung selten. Das charakteristische hämatomartige Bild mit dunkelroten, unscharf begrenzten Flecken tritt erst im fortgeschrittenen Stadium auf. Zu diesem Zeitpunkt ist die Prognose bereits infaust. Die Fünfjahresüberlebensraten wird mit 10-30% abgegeben, die mittlere Überlebenszeit liegt bei etwa 18-28 Monaten (215, 217).

Als Therapie wird eine rechtzeitige und großzügige Resektion des Tumors mit anschließender Bestrahlung des betroffenen Hautareals empfohlen (217). Eine Entfernung des Tumors *in toto* wird dadurch erschwert, dass die Tumorgrenzen aufgrund des multifokalen bis springenden Wachstums klinisch und histologisch nicht sicher zu bestimmen sind. Multiple Biopsien können deshalb zur Planung der Operation hilfreich sein. Durch eine postoperative adjuvante Radiatio kann die Prognose verbessert werden (218). Je nach Tumorstadium und Tumorfreiheit der Resektionsränder sollte die Strahlendosis zwischen 45 und 75 Gy liegen (217). Bei limitierten Möglichkeiten durch klassische Chemotherapeutika besteht auch hier ein hoher Bedarf für innovative Therapieansätze.

Die Proliferation der beiden humanen Angiosarkomzelllinien Iso Has und ASM und der murinphänotypischen Angiosarkomzelllinie ISOS 1 wurden sowohl durch die Inkubation mit Rapamycin als auch durch Celecoxib effektiv gehemmt. Durch Kombination beider Substanzen konnten die antiproliferativen Effekte in einigen Testes sogar gesteigert werden. Die beiden humanen Angiosarkomzelllinien Iso Has und ASM reagierten sensibler auf die Behandlung mit Rapamycin als die Melanomzelllinien, so dass hier schon bei 0,025 -0,2µM Rapamycin eine signifikante Reduktion des Zellwachstums

beobachtet werden konnte. Aufgrund der beeindruckenden antineoplastischen Potenz *in vitro* wäre die Untersuchung der Effekte von Rapamycin und Celecoxib auf Angiosarkome *in vivo* interessant. Da Masuzawa et al. berichteten, dass Iso Has Zellen in SCID Mäusen tumorigen sind (14), wurde versucht Angiosarkomzellen mit verbesserten Wachstumseigenschaften durch Passage in (immundefizienten) Mäusen zu erhalten. Im Rahmen dieser Tumorpropagation zur Optimierung der Zelllinien wurden durch die notwendige Überwachung der Tiere und insbesondere der Tumorlast auch Daten über die Tumorigenität der verwendeten Angiosarkomzellen gewonnen. Auch 14 Wochen nach der subkutanen Injektion bildeten die beiden humanen Angiosarkomzelllinien ASM und Iso Has keine Tumoren in SCID oder Balb/c nu/nu Mäusen. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die für beide Zelllinien weder eine Tumorentwicklung an der Injektionsstelle noch eine Metastasierung nachweisen konnte (13). ISOS 1 Zellen entstanden durch die subkutane Transplantation eines humanen Angiosarkoms in den Rumpf von SCID-Mäusen und die spätere subkutane oder intraperitoneale Inokulation der Zelllinie in weitere SCID-Mäuse (12), trotzdem wurden ISOS 1 als gering differenzierte, murinphänotypische Endothelzelllinien bezeichnet. In dieser Arbeit wuchsen nach subkutaner Injektion von ISOS 1 sowohl in NMRI nu/nu als auch in Balb/c nu/nu Mäusen subkutane Tumoren, die Aggressivität der Tumoren konnte durch die wiederholte Injektion der neu gebildeten Tumoren oder daraus etablierter Zelllinien gesteigert werden. In einer von der Abteilung für Experimentelle Chirurgie in Zusammenarbeit mit Dr. Gaumann (Institut für Pathologie) durchgeführten histologischen Untersuchung der subkutanen Tumoren konnte zwar gezeigt werden, dass es sich bei diesen Tumoren um Sarkome handelt. Jedoch konnte die Expression des angiosarkomtypischen Oberflächenmarkers CD31 weder mit einem humanen noch mit einem Maus-Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Auch bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung auf Weibel-Palade-Körper (durch Dr. Schröder, Institut für Pathologie) konnte kein positiver Befund erzielt werden. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob es sich bei den aus ISOS 1 gebildeten Tumoren wirklich um Angiosarkome handelt. Daher scheint ISOS 1 nicht für die Etablierung eines Tiermodells geeignet zu sein. Zusammenfassend kann man feststellen, dass Rapamycin und Celecoxib als Einzelsubstanzen oder in Kombination einen viel versprechenden Ansatz in der Therapie des Angiosarkoms darstellen und dass aus diesem Grund die Etablierung eines geeigneten Tiermodells ein viel versprechendes Projekt darstellen wird.

## 5.7 Kombinationstherapie

Trotz der genetischen Stabilität der Stromazellen scheint auch unter stromaorientierten Therapieregimen mit Einzelsubstanzen die Entwicklung von Resistenzmechanismen möglich zu sein. Durch die antiangiogenetische Therapie wird in peritumoralen Endothelzellen Apoptose induziert. Epigenetische Veränderungen in Stromazellen fördern die Hochregulation von antiapoptotischen Faktoren und modifizieren den Metabolismus der verabreichten Substanzen. Zudem kann die Apoptose in Endothelzellen durch antiapoptotische und überlebensfördernde Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF antagonisiert werden. Die Angiogenese wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren reguliert. Deshalb kann die gezielte Blockade eines Wachstumsfaktors oder seines Rezeptors durch die gesteigerte Produktion redundant wirkender proangiogenetischer Faktoren kompensiert werden (219). Da das sehr heterogene Tumorgefäßnetz durch vaskuläre Mimikry auch von Tumorzellen selbst gebildet wird, werden diese Zellen durch ein rein antiangiogenetisches Regime nicht erreicht (184). Zudem könnte eine antiangiogenetische Therapie auch die Selektion einzelner Tumorklone mit einem hohen Maß an Hypoxie-Toleranz fördern.

Diese Probleme scheinen aber vor allem bei monotherapeutischen Ansätzen aufzutreten. Um diesen „Escape-Mechanismen“ der Malignome entgegenzuwirken, ist eine Kombination mehrerer biomodulatorischer Substanzen, eventuell auch mit konventioneller oder metronom applizierter Chemotherapie, vorzuziehen.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine gleichzeitige Behandlung von Tumorzellen mit Rapamycin und Celecoxib zu synergistischen antineoplastischen Effekten führt. In A375 konnten die antiproliferative Wirkung der Einzelsubstanzen durch eine gleichzeitige Blockade der mTOR und COX 2 Aktivität signifikant verstärkt werden. Auch in den Angiosarkomzelllinien wurden in einigen Tests eine Steigerung der wachstumshemmenden Effekte gezeigt. Dagegen wurden in Mel Ho Melanomzellen keine additiven Effekte beobachtet. Da sich A375 und Mel Ho Zellen in ihrem COX 2 Expressionslevel unterscheiden, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Wirksamkeit der Rapamycin-Celecoxib-Kombination vom COX 2 Status der Tumorzellen abhängen könnte. Diese Vermutung deckt sich mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um El-Rayes, die postulierte, dass eine geringe COX 2 Baseline-Expression die positiven Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Celecoxib und Gemcitabin reduzieren könnte (220).

Gerade die Kombination von PPAR $\gamma$  Agonisten und COX 2 Inhibitoren könnte in der Tumorthherapie ein viel versprechendes Konzept darstellen. In Malignomen scheint zwischen PPAR $\gamma$  und COX 2 eine negative Wechselbeziehung zu bestehen (221-224). Die Inkubation von Zervixkarzinomzellen mit PPAR $\gamma$  Liganden führt zu einer Reduktion des COX 2 aber zu einer Steigerung des PPAR $\gamma$  mRNA Expressionslevels. Andererseits war die Aktivierung der COX 2 mit einer Verminderung des PPAR $\gamma$  Levels verbunden. Dieser Effekt konnte jedoch durch einen selektiven COX 2 Inhibitor gehemmt werden (222). In humanen Mammakarzinomzellen konnten durch die gleichzeitige Blockade der COX 2 und die Aktivierung von PPAR $\gamma$  synergistische proapoptotische und antiproliferative Effekte erzielt werden (225). A375 Melanomzellen wurden neben der Kombination aus Pioglitazon und Celecoxib auch mit Pioglitazon und Rapamycin sowie der Kombination aus allen drei Substanzen behandelt. Im Vergleich zu den Einzelsubstanzen bzw. der Rapamycin-Celecoxib Kombination wurde das Zellwachstum jedoch nicht effektiver gehemmt. Somit hatte Pioglitazon weder als Einzelsubstanz, noch in Kombination mit Rapamycin und/ oder Celecoxib antineoplastische Effekte auf A375 Melanomzellen.

Auch zytotoxische Chemotherapeutika können als antiangiogenetische Substanzen verwendet werden, wenn sie in regelmäßigen Abständen in geringer Dosis appliziert werden. Diese nach dem Prinzip der metronomen Chemotherapie eingesetzten Dosierungen liegen weit unterhalb der Maximaldosis, so dass auf längere Therapiepausen verzichtet werden kann und akute Nebenwirkungen seltener auftreten. Eine Kombination von COX 2 Hemmern und PPAR $\gamma$  Agonisten mit metronomer Chemotherapie zeigte in klinischen Studien in der Therapie von Angiosarkom, malignen Melanom, Weichteilsarkom sowie Langerhanszell-Histiozytose und Kaposi-Sarkom gute Ansprechraten (143, 148, 154, 226, 227). Diese Erfolge ermutigen dazu, in weiterführenden klinischen Studien optimale Therapiekonzepte für verschiedene Tumorentitäten zu etablieren.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Eine zytostatische Chemotherapie liefert bei der Behandlung fortgeschrittener Tumorerkrankungen oft nur unbefriedigende Ergebnisse. In der Dermatoonkologie stellt gerade die Behandlung des metastasierten Melanoms und des Angiosarkoms eine große Herausforderung dar. Interessanterweise besitzen einige primär nicht-onkologisch indizierte Medikamente wie COX 2 Hemmer, PPAR $\gamma$  Agonisten und mTOR Antagonisten über ihr ursprüngliches, nicht onkologisches, Indikationsgebiet hinaus sowohl direkte als auch indirekte, über das Stroma vermittelte, antitumorale Effekte. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Celecoxib, Pioglitazon und Rapamycin auf Proliferation und Apoptose von Melanom- und Angiosarkomzelllinien untersucht. Um auch die indirekten antitumorale Wirkung dieser Substanzen zu berücksichtigen, wurde zur Bestimmung des antiangiogenetischen Potentials von Celecoxib und Rapamycin ein tubular formation assay durchgeführt.

Die Messung der Zellproliferation erfolgte mit Hilfe des alamarBlue<sup>TM</sup> Assays, die Daten wurden durch den Cell Proliferation ELISA BrdU Assay bestätigt. Die Apoptose wurde mit dem Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay luminometrisch erfasst. Für Melanomzellen wurden zur Analyse der Zellzyklusverteilung die Zellkerne mit Propidium Iodid markiert und eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Mittels quantitativer real time RT-PCR wurde die Expression von COX 2 und PPAR $\gamma$  mRNA bestimmt. Um zu untersuchen, ob eventuelle antitumorale Effekte von Celecoxib und Pioglitazon vom COX 2 bzw. PPAR $\gamma$  Status der Zellen abhängen, wurden für die Tests Melanomzelllinien mit hoher (A375) und geringer (Mel Ho, IGR 1) COX 2 und PPAR $\gamma$  mRNA Expression ausgewählt.

Celecoxib und Rapamycin bewirkten in allen Zelllinien eine dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums. Durch die Kombination beider Substanzen konnten die antiproliferativen Effekte in einigen Zelllinien gesteigert werden. Pioglitazon hatte weder als Einzelsubstanz noch in Kombination mit Rapamycin und/ oder Celecoxib Einfluss auf die Zellproliferation. Celecoxib steigerte in den Zelllinien A375, Mel Ho und ISOS 1 die Aktivität der Caspasen 3 und 7, die proapoptotischen Effekte von Rapamycin waren in diesen Zelllinien gering ausgeprägt. Durch die Kombination beider Substanzen wurde die Apoptose in den Melanomzelllinien, nicht aber in ISOS 1 Angiosarkomzellen, gehemmt. Die Behandlung der Melanomzellen mit Rapamycin führte zu einer leichten Verschiebung in Richtung G<sub>1</sub> Phase des Zellzyklus. Sowohl Rapamycin als auch Cele-

coxib hemmten die Gefäßbildung im tubular formation assay. Im Rahmen der Etablierung von Angiosarkomzelllinien mit verbesserten Wachstumseigenschaften wurden durch die notwendige Überwachung der Tiere und der Tumorlast auch Daten über die Tumorigenität der verwendeten Angiosarkomzellen in immundefizienten Mäusen gewonnen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Rapamycin und Celecoxib sowohl als Einzelsubstanzen als auch in Kombination in Melanom- und Angiosarkomzellen die Proliferation hemmen, während Pioglitazon keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatte. Celecoxib induziert zusätzlich Apoptose. Die antiproliferativen und proapoptotischen Effekte von Celecoxib scheinen zumindest teilweise von der COX 2 Expression der Zelle unabhängig zu sein. Neben diesen direkten Wirkungen auf die Tumorzellen entfalten Rapamycin und Celecoxib auch antiangiogenetische Effekte. Sowohl Rapamycin als auch Celecoxib bergen ein viel versprechendes Potential für die palliative Therapie des metastasierenden Melanoms und insbesondere des Angiosarkoms. Weiterführende Studien sind nötig, um dieses Potential auch klinisch optimal nutzen zu können.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Garbe C, Hausschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann R-D, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A and Kaufmann R: Leitlinie Malignes Melanom, Version 15. 02/2005.
2. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC and Yaar M: The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340:1341-1348, 1999.
3. Lasithiotakis KG, Leiter U, Gorkiewicz R, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Strobel W and Garbe C: The incidence and mortality of cutaneous melanoma in Southern Germany: trends by anatomic site and pathologic characteristics, 1976 to 2003. *Cancer* 107:1331-1339, 2006.
4. Eng CP, Sehgal SN and Vezina C: Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)* 37:1231-1237, 1984.
5. Huang S and Houghton PJ: Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 3:371-377, 2003.
6. Pfizer: Fachinformation Celebrex Hartkapseln. 2008.
7. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB and Lipsky PE: Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J* 12:1063-1073, 1998.
8. Grommes C, Landreth GE and Heneka MT: Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 5:419-429, 2004.
9. Takeda Pharma: Fachinformation Actos TM 15 mg Tabletten. 2007.
10. Hafner C, Reichle A and Vogt T: New indications for established drugs: combined tumor-stroma-targeted cancer therapy with PPARgamma agonists, COX-2 inhibitors, mTOR antagonists and metronomic chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets* 5:393-419, 2005.
11. Gehlsen KR, Davis GE and Sriramaraio P: Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin Exp Metastasis* 10:111-120, 1992.
12. Masuzawa M, Fujimura T, Tsubokawa M, Nishiyama S, Katsuoka K, Terada E, Kunita S, Sakurai Y and Kato H: Establishment of a new murine-phenotypic angiosarcoma cell line (ISOS-1). *J Dermatol Sci* 16:91-98, 1998.
13. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Olert J, Bräuninger W, Brunner J and Kirkpatrick CJ: Establishment and Characterization of an Angiosarcoma-Derived Cell Line, AS-M. *Endothelium* 10:319-328, 2003.
14. Masuzawa M, Fujimura T, Hamada Y, Fujita Y, Hara H, Nishiyama S, Katsuoka K, Tamauchi H and Sakurai Y: Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int J Cancer* 81:305-308, 1999.
15. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51:1417-1423, 1973.
16. Morse HG and Moore GE: Cytogenetic homogeneity in eight independent sites in a case of malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 69:108-112, 1993.
17. Aubert C, Rouge F and Galindo JR: Tumorigenicity of human malignant melanocytes in nude mice in relation to their differentiation in vitro. *J Natl Cancer Inst* 64:1029-1040, 1980.
18. Holzmann B, Lehmann JM, Ziegler-Heitbrock HW, Funke I, Riethmüller G and Johnson JP: Glycoprotein P3.58, associated with tumor progression in malignant

- melanoma, is a novel leukocyte activation antigen. *Int J Cancer* 41:542-547, 1988.
19. Geisel J. 2005. Amplifikationstechniken. In *Labor und Diagnose*. T. Lothar, editor. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH. 1937-1949.
  20. McPherson M and Moller S. 2006. *PCR*. New York, Adingdon: Taylor&Francis.
  21. Rothe G, Barlage S, Orsó E and Schmitz G. 2005. Durchflusszytometrie in der klinischen Labordiagnostik. In *Labor und Diagnose*. T. Lothar, editor. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH. 1937-1949.
  22. Spector D, R.Goldman and Leinwand LA. 1998. *Cells, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  23. Auerbach R, Lewis R, Shinnors B, Kubai L and Akhtar N: Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49:32-40, 2003.
  24. Nicosia RF, McCormick JF and Bielunas J: The formation of endothelial webs and channels in plasma clot culture. *Scan Electron Microsc*:793-799, 1984.
  25. Bioscience B: Product specification Sheet Matrigel Basement Membrane Matrix.
  26. Fischereder M. 2005. m-TOR Inhibitoren. In *Immunsuppression*. H. Rupprecht, Ch.Buchardi, N. Mistry-Buchardi, M. Fischereder, and S. Weidner, editors. München, Jena: Urban&Fischer. 111-132.
  27. Bundscherer A, Hafner C and Vogt T: Neue Stromaorientierte Therapieoptionen in der palliativen Tumorthherapie. *J. Onkologie* 6:26-32, 2006.
  28. Wang T, Xu J, Yu X, Yang R and Han ZC: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol* 58:1-14, 2006.
  29. Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, Grappone C, Milani S, Galli A, Fiorelli G, Serio M and Mannelli M: Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1332-1339, 2005.
  30. Zang C, Wachter M, Liu H, Posch MG, Fenner MH, Stadelmann C, von Deimling A, Possinger K, Black KL, Koeffler HP and Elstner E: Ligands for PPAR-gamma and RAR cause induction of growth inhibition and apoptosis in human glioblastomas. *J Neurooncol* 65:107-118, 2003.
  31. , Nam DH, Ramachandran S, Song DK, Kwon KY, Jeon DS, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Bae I and Cho CH: Growth inhibition and apoptosis induced in human leiomyoma cells by treatment with the PPAR gamma ligand ciglitizone. *Mol Hum Reprod* 13:829-836, 2007.
  32. , Saiki M, Hatta Y, Yamazaki T, Itoh T, Enomoto Y, Takeuchi J, Sawada U, Aizawa S and Horie T: Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol* 29:437-443, 2006.
  33. Nakashiro KI, Hayashi Y, Kita A, Tamatani T, Chlenski A, Usuda N, Hattori K, Reddy JK and Oyasu R: Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its ligands in non-neoplastic and neoplastic human urothelial cells. *Am J Pathol* 159:591-597, 2001.
  34. Placha W, Gil D, Dembinska-Kiec A and Laidler P: The effect of PPARgamma ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res* 13:447-456, 2003.
  35. Nunez NP, Liu H and Meadows GG: PPAR-gamma ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2005.

36. Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U and Thies A: Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 17:325-332, 2006.
37. Balasubramanian S, Chandraratna RA and Eckert RL: Suppression of human pancreatic cancer cell proliferation by AGN194204, an RXR-selective retinoid. *Carcinogenesis* 25:1377-1385, 2004.
38. Niu XW, Peng ZH, Feng J, Ma HQ, Liu C and Yuan JY: Mechanism of retinoid receptors in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human melanoma cell line A375. *Chin Med J (Engl)* 118:1482-1486, 2005.
39. Hirase N, Yanase T, Mu Y, Muta K, Umemura T, Takayanagi R and Nawata H: Thiazolidinedione induces apoptosis and monocytic differentiation in the promyelocytic leukemia cell line HL60. *Oncology* 57 Suppl 2:17-26, 1999.
40. Asou H, Verbeek W, Williamson E, Elstner E, Kubota T, Kamada N and Koefler HP: Growth inhibition of myeloid leukemia cells by troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma, and retinoids. *Int J Oncol* 15:1027-1031, 1999.
41. Crowe DL and Chandraratna RA: A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res* 6:R546-555, 2004.
42. Yamazaki K, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Kanemura N, Araki H, Tsurumi H, Kojima S, Weinstein IB and Moriwaki H: Synergistic effects of RXR alpha and PPAR gamma ligands to inhibit growth in human colon cancer cells--phosphorylated RXR alpha is a critical target for colon cancer management. *Gut* 56:1557-1563, 2007.
43. Chakravarti N, Lotan R, Diwan AH, Warneke CL, Johnson MM and Prieto VG: Decreased expression of retinoid receptors in melanoma: entailment in tumorigenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* 13:4817-4824, 2007.
44. Klopper JP, Hays WR, Sharma V, Baumbusch MA, Hershman JM and Haugen BR: Retinoid X receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinedione treatment. *Mol Cancer Ther* 3:1011-1020, 2004.
45. Liu Y, Meng Y, Liu H, Li J, Fu J and Chen X: Growth inhibition and differentiation induced by peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand rosiglitazone in human melanoma cell line a375. *Med Oncol* 23:393-402, 2006.
46. Abe A, Kiriya Y, Hirano M, Miura T, Kamiya H, Harashima H and Tokumitsu Y: Troglitazone suppresses cell growth of KU812 cells independently of PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 436:7-13, 2002.
47. Chaffer CL, Thomas DM, Thompson EW and Williams ED: PPARgamma-independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer* 6:53, 2006.
48. Emery MN, Leontiou C, Bonner SE, Merulli C, Nanzer AM, Musat M, Galloway M, Powell M, Nikookam K, Korbonits M and Grossman AB: PPAR-gamma expression in pituitary tumours and the functional activity of the glitazones: evidence that any anti-proliferative effect of the glitazones is independent of the PPAR-gamma receptor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:389-395, 2006.
49. Galli A, Ceni E, Crabb DW, Mello T, Salzano R, Grappone C, Milani S, Surrenti E, Surrenti C and Casini A: Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPARgamma independent mechanisms. *Gut* 53:1688-1697, 2004.

50. Nakashiro K, Begum NM, Uchida D, Kawamata H, Shintani S, Sato M and Hamakawa H: Thiazolidinediones inhibit cell growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Oral Oncol* 39:855-861, 2003.
51. Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS and Huang JW: Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma. *Cancer Res* 65:1561-1569, 2005.
52. Inoue I, Katayama S, Takahashi K, Negishi K, Miyazaki T, Sonoda M and Komoda T: Troglitazone has a scavenging effect on reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun* 235:113-116, 1997.
53. Lin MS, Chen WC, Bai X and Wang YD: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits cell growth via apoptosis and arrest of the cell cycle in human colorectal cancer. *J Dig Dis* 8:82-88, 2007.
54. Yang YC, Tsao YP, Ho TC and Choung IP: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists cause growth arrest and apoptosis in human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Gynecol Cancer* 17:418-425, 2007.
55. Zander T, Kraus JA, Grommes C, Schlegel U, Feinstein D, Klockgether T, Landreth G, Koenigsknecht J and Heneka MT: Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPARgamma. *J Neurochem* 81:1052-1060, 2002.
56. Yang FG, Zhang ZW, Xin DQ, Shi CJ, Wu JP, Guo YL and Guan YF: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands induce cell cycle arrest and apoptosis in human renal carcinoma cell lines. *Acta Pharmacol Sin* 26:753-761, 2005.
57. Shen D, Deng C and Zhang M: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgrad Med J* 83:414-419, 2007.
58. Saiki M, Hatta Y, Yamazaki T, Itoh T, Enomoto Y, Takeuchi J, Sawada U, Aizawa S and Horie T: Pioglitazone inhibits the growth of human leukemia cell lines and primary leukemia cells while sparing normal hematopoietic stem cells. *Int J Oncol* 29:437-443, 2006.
59. Keshamouni VG, Reddy RC, Arenberg DA, Joel B, Thannickal VJ, Kalkerian GP and Standiford TJ: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23:100-108, 2004.
60. Kawa S, Nikaido T, Unno H, Usuda N, Nakayama K and Kiyosawa K: Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone. *Pancreas* 24:1-7, 2002.
61. Yoshizawa K, Cioca DP, Kawa S, Tanaka E and Kiyosawa K: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer* 95:2243-2251, 2002.
62. Frohlich E, Machicao F and Wahl R: Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture. *Endocr Relat Cancer* 12:291-303, 2005.
63. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM and Spiegelman BM: Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:237-241, 1997.

64. Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM and Singer S: Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3951-3956, 1999.
65. Vezina C, Kudelski A and Sehgal SN: Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)* 28:721-726, 1975.
66. Douros J and Suffness M: New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev* 8:63-87, 1981.
67. Hidalgo M and Rowinsky EK: The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene* 19:6680-6686, 2000.
68. Seeliger H, Guba M, Kleespies A, Jauch KW and Bruns CJ: Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 26:611-621, 2007.
69. Petroulakis E, Mamane Y, Le Bacquer O, Shahbazian D and Sonenberg N: mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. *Br J Cancer* 94:195-199, 2006.
70. Zhou C, Gehrig PA, Whang YE and Boggess JF: Rapamycin inhibits telomerase activity by decreasing the hTERT mRNA level in endometrial cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2:789-795, 2003.
71. Metcalfe SM, Canman CE, Milner J, Morris RE, Goldman S and Kastan MB: Rapamycin and p53 act on different pathways to induce G1 arrest in mammalian cells. *Oncogene* 15:1635-1642, 1997.
72. Aguirre D, Boya P, Bellet D, Faivre S, Troalen F, Benard J, Saulnier P, Hopkins-Donaldson S, Zangemeister-Wittke U, Kroemer G and Raymond E: Bcl-2 and CCND1/CDK4 expression levels predict the cellular effects of mTOR inhibitors in human ovarian carcinoma. *Apoptosis* 9:797-805, 2004.
73. Reifemberger J, Wolter M, Bostrom J, Buschges R, Schulte KW, Megahed M, Ruzicka T and Reifemberger G: Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. *Virchows Arch* 436:487-493, 2000.
74. Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpner KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncso P, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA and et al.: MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res* 57:5221-5225, 1997.
75. Yao YJ, Ping XL, Zhang H, Chen FF, Lee PK, Ahsan H, Chen CJ, Lee PH, Peacocke M, Santella RM and Tsou HC: PTEN/MMAC1 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 18:3181-3185, 1999.
76. Bae JJ, Rho JW, Lee TJ, Yun SS, Kim HJ, Choi JH, Jeong D, Jang BC and Lee TY: Loss of heterozygosity on chromosome 10q23 and mutation of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 tumor suppressor gene in Korean hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Rep* 18:1007-1013, 2007.
77. Wang DS, Rieger-Christ K, Latini JM, Moizadeh A, Stoffel J, Pezza JA, Saini K, Libertino JA and Summerhayes IC: Molecular analysis of PTEN and MXI1 in primary bladder carcinoma. *Int J Cancer* 88:620-625, 2000.
78. Verhagen PC, van Duijn PW, Hermans KG, Looijenga LH, van Gurp RJ, Stoop H, van der Kwast TH and Trapman J: The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol* 208:699-707, 2006.

79. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK and Wong YF: Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 93:621-627, 2004.
80. DeGraffenried LA, Fulcher L, Friedrichs WE, Grunwald V, Ray RB and Hidalgo M: Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway. *Ann Oncol* 15:1510-1516, 2004.
81. Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H and Sawyers CL: Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10314-10319, 2001.
82. Pollock PM, Walker GJ, Glendening JM, Que Noy T, Bloch NC, Fountain JW and Hayward NK: PTEN inactivation is rare in melanoma tumours but occurs frequently in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 12:565-575, 2002.
83. Tsao H, Zhang X, Fowlkes K and Haluska FG: Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res* 60:1800-1804, 2000.
84. Wu H, Goel V and Haluska FG: PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 22:3113-3122, 2003.
85. Tsao H, Zhang X, Benoit E and Haluska FG: Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 16:3397-3402, 1998.
86. Guldberg P, thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF and Zeuthen J: Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 57:3660-3663, 1997.
87. Dickerson EB, Thomas R, Fosmire SP, Lamerato-Kozicki AR, Bianco SR, Wojcieszyn JW, Breen M, Helfand SC and Modiano JF: Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma. *Vet Pathol* 42:618-632, 2005.
88. Tate G, Suzuki T and Mitsuya T: Mutation of the PTEN gene in a human hepatic angiosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 178:160-162, 2007.
89. Zitzmann K, De Toni EN, Brand S, Goke B, Meinecke J, Spottl G, Meyer HH and Auernhammer CJ: The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology* 85:54-60, 2007.
90. Luan FL, Ding R, Sharma VK, Chon WJ, Lagman M and Suthanthiran M: Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis. *Kidney Int* 63:917-926, 2003.
91. Hosoi H, Dilling MB, Shikata T, Liu LN, Shu L, Ashmun RA, Germain GS, Abraham RT and Houghton PJ: Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 59:886-894, 1999.
92. Calastretti A, Rancati F, Ceriani MC, Asnaghi L, Canti G and Nicolin A: Rapamycin increases the cellular concentration of the BCL-2 protein and exerts an anti-apoptotic effect. *Eur J Cancer* 37:2121-2128, 2001.
93. Vega F, Medeiros LJ, Leventaki V, Atwell C, Cho-Vega JH, Tian L, Claret FX and Rassidakis GZ: Activation of mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to tumor cell survival in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res* 66:6589-6597, 2006.
94. Huang S, Liu LN, Hosoi H, Dilling MB, Shikata T and Houghton PJ: p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res* 61:3373-3381, 2001.



95. Boffa DJ, Luan F, Thomas D, Yang H, Sharma VK, Lagman M and Suthanthiran M: Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:293-300, 2004.
96. Shi Y, Yan H, Frost P, Gera J and Lichtenstein A: Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther* 4:1533-1540, 2005.
97. Johnsen JJ, Segerstrom L, Orrego A, Elfman L, Henriksson M, Kagedal B, Eksborg S, Sveinbjornsson B and Kogner P: Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncogene*, 2007.
98. Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S and Venuta S: Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer* 40:2829-2836, 2004.
99. Marimpietri D, Brignole C, Nico B, Pastorino F, Pezzolo A, Piccardi F, Cilli M, Di Paolo D, Pagnan G, Longo L, Perri P, Ribatti D and Ponzoni M: Combined therapeutic effects of vinblastine and rapamycin on human neuroblastoma growth, apoptosis, and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 13:3977-3988, 2007.
100. Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulidakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF and Testa JR: RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 13:4261-4270, 2007.
101. Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, Kawamura A, Kondoh T, Hosoda K, Fujiiwara T and Kohmura E: Specific mTOR inhibitor rapamycin enhances cytotoxicity induced by alkylating agent 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea (ACNU) in human U251 malignant glioma cells. *J Neurooncol* 84:233-244, 2007.
102. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB and De Marzo AM: Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett* 215:1-20, 2004.
103. Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R and Serhan CN: COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69:339-343, 2003.
104. DeWitt DL: Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 55:625-631, 1999.
105. FAD Public Health Advisory.  
<http://www.fad.gov/cder/drug/advisory/COX2.htm>, 07.04.2005.
106. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K and Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 7:429-434, 2001.
107. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT and Fahey TJ, 3rd: Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 59:987-990, 1999.
108. Nakopoulou L, Mylona E, Papadaki I, Kapranou A, Giannopoulou I, Markaki S and Keramopoulos A: Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a favorable prognostic phenotype in breast carcinoma. *Pathobiology* 72:241-249, 2005.
109. VANDOROS GP, KONSTANTINPOULOS PA, SOTIROPOULOU-BONIKOU G, KOMINEA A, PAPACHRISTOU GI, KARAMOZIS MV, GKERMPEZI M, VARAKIS I and PAPAVASSILIOU AG: PPAR-gamma is expressed and NF-kB pathway is activated and correlates

- positively with COX-2 expression in stromal myofibroblasts surrounding colon adenocarcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:76-84, 2006.
110. Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ and Lin DX: Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* 20:107-114, 2003.
  111. Vogt T, McClelland M, Jung B, Popova S, Bogenrieder T, Becker B, Rumpler G, Landthaler M and Stolz W: Progression and NSAID-induced apoptosis in malignant melanomas are independent of cyclooxygenase II. *Melanoma Res* 11:587-599, 2001.
  112. Goulet AC, Einsphar JG, Alberts DS, Beas A, Burk C, Bhattacharyya A, Bangert J, Harmon JM, Fujiwara H, Koki A and Nelson MA: Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. *Cancer Biol Ther* 2:713-718, 2003.
  113. Denkert C, Kobel M, Berger S, Siegert A, Leclere A, Trefzer U and Hauptmann S: Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 61:303-308, 2001.
  114. Chwirot BW and Kuzbicki L: Cyclooxygenase-2 (COX-2): first immunohistochemical marker distinguishing early cutaneous melanomas from benign melanocytic skin tumours. *Melanoma Res* 17:139-145, 2007.
  115. Chiu LC, Tong KF and Ooi VE: Cytostatic and cytotoxic effects of cyclooxygenase inhibitors and their synergy with docosahexaenoic acid on the growth of human skin melanoma A-375 cells. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S293-297, 2005.
  116. Han C, Leng J, Demetris AJ and Wu T: Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest. *Cancer Res* 64:1369-1376, 2004.
  117. Cui W, Yu CH and Hu KQ: In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11:8213-8221, 2005.
  118. Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Cordon-Cardo C, Thaler HT and Dannenberg AJ: Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin Cancer Res* 11:1999-2007, 2005.
  119. Chen JC, Chen Y, Su YH and Tseng SH: Celecoxib increased expression of 14-3-3sigma and induced apoptosis of glioma cells. *Anticancer Res* 27:2547-2554, 2007.
  120. Dandekar DS, Lopez M, Carey RI and Lokeshwar BL: Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug-induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 115:484-492, 2005.
  121. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ and Mukherjee P: Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res* 2:632-642, 2004.
  122. Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Brucato L, Benetti E, Collino M and Fantozzi R: Celecoxib decreases expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in a colon cancer cell line (HT29). *Br J Pharmacol*, 2007.
  123. Liu X, Yue P, Zhou Z, Khuri FR and Sun SY: Death receptor regulation and celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 96:1769-1780, 2004.

124. He Q, Luo X, Jin W, Huang Y, Reddy MV, Reddy EP and Sheikh MS: Celecoxib and a novel COX-2 inhibitor ON09310 upregulate death receptor 5 expression via GADD153/CHOP. *Oncogene*, 2007.
125. Song YC, Kim SH, Juhnn YS and Song YS: Apoptotic effect of celecoxib dependent upon p53 status in human ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* 1095:26-34, 2007.
126. Kardosh A, Blumenthal M, Wang WJ, Chen TC and Schonthal AH: Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol Ther* 3:55-62, 2004.
127. Bock JM, Menon SG, Sinclair LL, Bedford NS, Goswami PC, Domann FE and Trask DK: Celecoxib toxicity is cell cycle phase specific. *Cancer Res* 67:3801-3808, 2007.
128. Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L and Geisslinger G: COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *Faseb J* 15:2742-2744, 2001.
129. Williams CS, Watson AJ, Sheng H, Helou R, Shao J and DuBois RN: Celecoxib prevents tumor growth in vivo without toxicity to normal gut: lack of correlation between in vitro and in vivo models. *Cancer Res* 60:6045-6051, 2000.
130. Gee J, Lee IL, Jendiroba D, Fischer SM, Grossman HB and Sabichi AL: Selective cyclooxygenase-2 inhibitors inhibit growth and induce apoptosis of bladder cancer. *Oncol Rep* 15:471-477, 2006.
131. Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM and Burton J: Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res* 62:2029-2033, 2002.
132. Kim SH, Song SH, Kim SG, Chun KS, Lim SY, Na HK, Kim JW, Surh YJ, Bang YJ and Song YS: Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:551-560, 2004.
133. Kulp SK, Yang YT, Hung CC, Chen KF, Lai JP, Tseng PH, Fowble JW, Ward PJ and Chen CS: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1/Akt signaling represents a major cyclooxygenase-2-independent target for celecoxib in prostate cancer cells. *Cancer Res* 64:1444-1451, 2004.
134. Tegeder I, Pfeilschifter J and Geisslinger G: Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *Faseb J* 15:2057-2072, 2001.
135. Namba R, Young LJ, Abbey CK, Kim L, Damonte P, Borowsky AD, Qi J, Tepper CG, MacLeod CL, Cardiff RD and Gregg JP: Rapamycin inhibits growth of premalignant and malignant mammary lesions in a mouse model of ductal carcinoma in situ. *Clin Cancer Res* 12:2613-2621, 2006.
136. Nunez NP, Liu H and Meadows GG: PPAR-gamma ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer Lett* 236:133-141, 2006.
137. Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM and Halperin JA: Anti-cancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61:6213-6218, 2001.
138. Axelson J, Lindell M, Horlin K and Ohlsson B: Inhibition of different intracellular signal cascades in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology* 5:251-258, 2005.
139. Proud CG: mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 313:429-436, 2004.

140. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, Lauriola L, Salutari V, Gessi M, Testa AC, Werner U, Navarra P, Tringali G, Battaglia A and Scambia G: Celecoxib modulates the expression of cyclooxygenase-2, ki67, apoptosis-related marker, and microvessel density in human cervical cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 9:4324-4331, 2003.
141. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW and Geissler EK: Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 8:128-135, 2002.
142. Meier-Kriesche HU and Kaplan B: Toxicity and efficacy of sirolimus: relationship to whole-blood concentrations. *Clin Ther* 22 Suppl B:B93-100, 2000.
143. Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, Landthaler M, Andreesen R and Reichle A: Antiangiogenetic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trofosfamide in patients with advanced malignant vascular tumors. *Cancer* 98:2251-2256, 2003.
144. Gadgeel SM, Ruckdeschel JC, Heath EI, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R and Wozniak A: Phase II study of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), and celecoxib, a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, in patients with platinum refractory non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol* 2:299-305, 2007.
145. Milton DT, Riely GJ, Azzoli CG, Gomez JE, Heelan RT, Kris MG, Krug LM, Pao W, Pizzo B, Rizvi NA and Miller VA: Phase 1 trial of everolimus and gefitinib in patients with advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 110:599-605, 2007.
146. Altorki NK, Keresztes RS, Port JL, Libby DM, Korst RJ, Flieder DB, Ferrara CA, Yankelevitz DF, Subbaramaiah K, Pasmantier MW and Dannenberg AJ: Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 21:2645-2650, 2003.
147. Levin VA, Giglio P, Puduvalli VK, Johech J, Groves MD, Yung WK and Hess K: Combination chemotherapy with 13-cis-retinoic acid and celecoxib in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 1:1-6, 2005.
148. Coras B, Hafner C, Reichle A, Hohenleutner U, Szeimies RM, Landthaler M and Vogt T: Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and trofosfamide in a patient with endemic kaposi sarcoma. *Arch Dermatol* 140:1504-1507, 2004.
149. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP and Grandaliano G: Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 352:1317-1323, 2005.
150. Becerra CR, Frenkel EP, Ashfaq R and Gaynor RB: Increased toxicity and lack of efficacy of Rofecoxib in combination with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal cancer: A phase II study. *Int J Cancer* 105:868-872, 2003.
151. Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciort R, Debiec-Rychter M, Oyen R and Van Oosterom A: A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 89:1409-1412, 2003.
152. Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh J, Rich JN, Gururangan S, Badruddoja M, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Friedman AH and Friedman HS: Phase II trial of irinotecan plus celecoxib in adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 103:329-338, 2005.
153. Dang CT, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K, Dickler MN, Moasser MM, Seidman AD, D'Andrea GM, Theodoulou M, Panageas KS, Norton L and Hudis CA:

- Phase II study of celecoxib and trastuzumab in metastatic breast cancer patients who have progressed after prior trastuzumab-based treatments. *Clin Cancer Res* 10:4062-4067, 2004.
154. Reichle A, Bross K, Vogt T, Bataille F, Wild P, Berand A, Krause SW and Andreesen R: Pioglitazone and rofecoxib combined with angiostatically scheduled trofosfamide in the treatment of far-advanced melanoma and soft tissue sarcoma. *Cancer* 101:2247-2256, 2004.
  155. Spieth K, Kaufmann R and Gille J: Metronomic oral low-dose treosulfan chemotherapy combined with cyclooxygenase-2 inhibitor in pretreated advanced melanoma: a pilot study. *Cancer Chemother Pharmacol* 52:377-382, 2003.
  156. Gogas H, Polyzos A, Stavriniadis I, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Markopoulos C, Papadopoulos O, Pectasides D, Mantzourani M, Middleton M, Vaiopoulos G and Fountzilias G: Temozolomide in combination with celecoxib in patients with advanced melanoma. A phase II study of the hellenic cooperative oncology group. *Ann Oncol*, 2006.
  157. Margolin K, Longmate J, Baratta T, Synold T, Christensen S, Weber J, Gajewski T, Quirt I and Doroshow JH: CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium. *Cancer* 104:1045-1048, 2005.
  158. Prince HM, Mileschkin L, Roberts A, Ganju V, Underhill C, Catalano J, Bell R, Seymour JF, Westerman D, Simmons PJ, Lillie K, Milner AD, Iulio JD, Zeldis JB and Ramsay R: A multicenter phase II trial of thalidomide and celecoxib for patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 11:5504-5514, 2005.
  159. Motzer RJ, Hudes GR, Curti BD, McDermott DF, Escudier BJ, Negrier S, Dutclos B, Moore L, O'Toole T, Boni JP and Dutcher JP: Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 25:3958-3964, 2007.
  160. Buckstein R, Kerbel RS, Shaked Y, Nayar R, Foden C, Turner R, Lee CR, Taylor D, Zhang L, Man S, Baruchel S, Stempak D, Bertolini F and Crump M: High-Dose Celecoxib and Metronomic "Low-dose" Cyclophosphamide Is an Effective and Safe Therapy in Patients with Relapsed and Refractory Aggressive Histology Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res* 12:5190-5198, 2006.
  161. Ferrari V, Valcamonico F, Amoroso V, Simoncini E, Vassalli L, Marpicati P, Rangoni G, Grisanti S, Tiberio GA, Nodari F, Strina C and Marini G: Gemcitabine plus celecoxib (GECO) in advanced pancreatic cancer: a phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:185-190, 2006.
  162. Wirth LJ, Haddad RI, Lindeman NI, Zhao X, Lee JC, Joshi VA, Norris CM, Jr. and Posner MR: Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 23:6976-6981, 2005.
  163. Szanto A and Nagy L: Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Mol Pharmacol* 67:1935-1943, 2005.
  164. Szatmari I, Gogolak P, Im JS, Dezso B, Rajnavolgyi E and Nagy L: Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity* 21:95-106, 2004.
  165. Evans JF and Kargman SL: Cancer and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition. *Curr Pharm Des* 10:627-634, 2004.
  166. Kundu N, Walser TC, Ma X and Fulton AM: Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother* 54:981-987, 2005.

167. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC and Dubinett SM: Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 164:361-370, 2000.
168. Grommes C, Landreth GE, Sastre M, Beck M, Feinstein DL, Jacobs AH, Schlegel U and Heneka MT: Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist treatment. *Mol Pharmacol* 70:1524-1533, 2006.
169. Kwak YE, Jeon NK, Kim J and Lee EJ: The cyclooxygenase-2 selective inhibitor celecoxib suppresses proliferation and invasiveness in the human oral squamous carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 1095:99-112, 2007.
170. Kinugasa Y, Hatori M, Ito H, Kurihara Y, Ito D and Nagumo M: Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 and CD44. *Clin Exp Metastasis* 21:737-745, 2004.
171. Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S and Brodt P: Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem* 279:19683-19690, 2004.
172. Zhang D and Brodt P: Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene* 22:974-982, 2003.
173. Coras R, Holsken A, Seufert S, Hauke J, Eyupoglu IY, Reichel M, Trankle C, Siebzehnruhl FA, Buslei R, Blumcke I and Hahnen E: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone inhibits transforming growth factor-beta-mediated glioma cell migration and brain invasion. *Mol Cancer Ther* 6:1745-1754, 2007.
174. Yang YC, Ho TC, Chen SL, Lai HY, Wu JY and Tsao YP: Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer* 7:216, 2007.
175. Lang SA, Gaumann A, Koehl GE, Seidel U, Bataille F, Klein D, Ellis LM, Bolder U, Hofstaedter F, Schlitt HJ, Geissler EK and Stoeltzing O: Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model. *Int J Cancer* 120:1803-1810, 2007.
176. Carmeliet P and Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257, 2000.
177. de Castro Junior G, Puglisi F, de Azambuja E, El Saghir NS and Awada A: Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Crit Rev Oncol Hematol* 59:40-50, 2006.
178. Cao Y: Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 14:139-145, 2004.
179. Patan S, Munn LL and Jain RK: Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 51:260-272, 1996.
180. Hillen F and Griffioen AW: Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 26:489-502, 2007.
181. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJ: Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155:739-752, 1999.
182. Folberg R, Hendrix MJ and Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 156:361-381, 2000.

183. van der Schaft DW, Seftor RE, Seftor EA, Hess AR, Gruman LM, Kirschmann DA, Yokoyama Y, Griffioen AW and Hendrix MJ: Effects of angiogenesis inhibitors on vascular network formation by human endothelial and melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 96:1473-1477, 2004.
184. Folberg R and Maniotis AJ: Vasculogenic mimicry. *Apmis* 112:508-525, 2004.
185. di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, McDonald DM, Jones R and Munn LL: Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 65:5740-5749, 2005.
186. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M and McDonald DM: Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 163:1801-1815, 2003.
187. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK and McDonald DM: Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156:1363-1380, 2000.
188. Soo RA, Wu J, Aggarwal A, Tao Q, Hsieh W, Putti T, Tan KB, Soon WL, Lai YF, Mow B, Hsu S, Loh KS, Tan L, Tan P and Goh BC: Celecoxib reduces microvessel density in patients treated with nasopharyngeal carcinoma and induces changes in gene expression. *Ann Oncol* 17:1625-1630, 2006.
189. Yoshinaka R, Shibata MA, Morimoto J, Tanigawa N and Otsuki Y: COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res* 26:4245-4254, 2006.
190. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Vollmar B and Menger MD: Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 87:163-171, 2007.
191. Ragel BT, Jensen RL, Gillespie DL, Prescott SM and Couldwell WT: Celecoxib inhibits meningioma tumor growth in a mouse xenograft model. *Cancer* 109:588-597, 2007.
192. Ueno T, Chow LW and Toi M: Increases in circulating VEGF levels during COX-2 inhibitor treatment in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 60:277-279, 2006.
193. Lee A, Frischer J, Serur A, Huang J, Bae JO, Kornfield ZN, Eljuga L, Shawber CJ, Feirt N, Mansukhani M, Stempak D, Baruchel S, Bender JG, Kandel JJ and Yamashiro DJ: Inhibition of cyclooxygenase-2 disrupts tumor vascular mural cell recruitment and survival signaling. *Cancer Res* 66:4378-4384, 2006.
194. Rafii S and Lyden D: Cancer. A few to flip the angiogenic switch. *Science* 319:163-164, 2008.
195. Zhang P, Huang L, Zhu GX, Cui B, Song MB, Zhou YP, Zhao XH and Yin YG: [Sirolimus inhibits the differentiation, proliferation and migration of endothelial progenitor cells in vitro]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 34:1021-1025, 2006.
196. Colleselli D, Bijuklic K, Mosheimer BA and Kahler CM: Inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 affects endothelial progenitor cell proliferation. *Exp Cell Res* 312:2933-2941, 2006.
197. Chen TG, Chen JZ and Wang XX: Effects of rapamycin on number activity and eNOS of endothelial progenitor cells from peripheral blood. *Cell Prolif* 39:117-125, 2006.
198. Twardowski PW, Smith-Powell L, Carroll M, VanBalgooy J, Ruel C, Frankel P and Synold TW: Biologic markers of angiogenesis: circulating endothelial cells

- in patients with advanced malignancies treated on phase I protocol with metronomic chemotherapy and celecoxib. *Cancer Invest* 26:53-59, 2008.
199. Land SC and Tee AR: Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* 282:20534-20543, 2007.
  200. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G and Milella M: Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res* 66:5549-5554, 2006.
  201. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ and Abraham RT: Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22:7004-7014, 2002.
  202. Wang Y, Zhao Q, Ma S, Yang F, Gong Y and Ke C: Sirolimus inhibits human pancreatic carcinoma cell proliferation by a mechanism linked to the targeting of mTOR/HIF-1 alpha/VEGF signaling. *IUBMB Life* 59:717-721, 2007.
  203. Semela D, Piguet AC, Kolev M, Schmitter K, Hlushchuk R, Djonov V, Stoupis C and Dufour JF: Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 46:840-848, 2007.
  204. Guba M, Koehl GE, Neppl E, Doenecke A, Steinbauer M, Schlitt HJ, Jauch KW and Geissler EK: Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int* 18:89-94, 2005.
  205. Laschke MW, Elitzsch A, Scheuer C, Holstein JH, Vollmar B and Menger MD: Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 149:137-144, 2006.
  206. Bruns CJ, Koehl GE, Guba M, Yezhelyev M, Steinbauer M, Seeliger H, Schwend A, Hoehn A, Jauch KW and Geissler EK: Rapamycin-induced endothelial cell death and tumor vessel thrombosis potentiate cytotoxic therapy against pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 10:2109-2119, 2004.
  207. Guba M, Yezhelyev M, Eichhorn ME, Schmid G, Ischenko I, Pappayan A, Graeb C, Seeliger H, Geissler EK, Jauch KW and Bruns CJ: Rapamycin induces tumor-specific thrombosis via tissue factor in the presence of VEGF. *Blood* 105:4463-4469, 2005.
  208. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR and Lawley TJ: Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107:1589-1598, 1988.
  209. Del Bufalo D, Trisciuglio D, Scarsella M, D'Amati G, Candiloro A, Iervolino A, Leonetti C and Zupi G: Lonidamine causes inhibition of angiogenesis-related endothelial cell functions. *Neoplasia* 6:513-522, 2004.
  210. Pollman MJ, Naumovski L and Gibbons GH: Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J Cell Physiol* 178:359-370, 1999.
  211. Choi DY, Huh JE, Lee JD, Cho EM, Baek YH, Yang HR, Cho YJ, Kim KI, Kim DY and Park DS: *Uncaria rhynchophylla* induces angiogenesis in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull* 28:2248-2252, 2005.
  212. Dormond O, Bezzi M, Mariotti A and Ruegg C: Prostaglandin E2 promotes integrin alpha Vbeta 3-dependent endothelial cell adhesion, rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *J Biol Chem* 277:45838-45846, 2002.
  213. Merchan JR, Chan B, Kale S, Schnipper LE and Sukhatme VP: In vitro and in vivo induction of antiangiogenic activity by plasminogen activators and captopril. *J Natl Cancer Inst* 95:388-399, 2003.



214. Gamble JR, Matthias LJ, Meyer G, Kaur P, Russ G, Faull R, Berndt MC and Vadas MA: Regulation of in vitro capillary tube formation by anti-integrin antibodies. *J Cell Biol* 121:931-943, 1993.
215. Vogt T: [Angiosarcoma.]. *Hautarzt*, 2008.
216. Huang J and Mackillop WJ: Increased risk of soft tissue sarcoma after radiotherapy in women with breast carcinoma. *Cancer* 92:172-180, 2001.
217. Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Reith JD and Mendenhall NP: Cutaneous angiosarcoma. *Am J Clin Oncol* 29:524-528, 2006.
218. Pawlik TM, Paulino AF, McGinn CJ, Baker LH, Cohen DS, Morris JS, Rees R and Sondak VK: Cutaneous angiosarcoma of the scalp: a multidisciplinary approach. *Cancer* 98:1716-1726, 2003.
219. Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL and Rak J: Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20:79-86, 2001.
220. El-Rayes BF, Ali S, Sarkar FH and Philip PA: Cyclooxygenase-2-dependent and -independent effects of celecoxib in pancreatic cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 3:1421-1426, 2004.
221. Konstantinopoulos PA, Vondoros GP, Sotiropoulou-Bonikou G, Kominea A and Papavassiliou AG: NF-kappaB/PPARgamma and/or AP-1/PPARgamma 'on/off' switches and induction of CBP in colon adenocarcinomas: correlation with COX-2 expression. *Int J Colorectal Dis*, 2006.
222. Han S, Inoue H, Flowers LC and Sidell N: Control of COX-2 gene expression through peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human cervical cancer cells. *Clin Cancer Res* 9:4627-4635, 2003.
223. Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Rocken C, Malfertheiner P and Farrell GC: Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Hepatology* 43:134-143, 2006.
224. Stadlmann S, Gueth U, Wight E, Kunz-Schughart L, Hartmann A and Singer G: Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in primary and recurrent ovarian carcinoma. *J Clin Pathol*, 2006.
225. Badawi AF, Eldeen MB, Liu Y, Ross EA and Badr MZ: Inhibition of rat mammary gland carcinogenesis by simultaneous targeting of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cancer Res* 64:1181-1189, 2004.
226. Reichle A, Vogt T, Kunz-Schughart L, Bretschneider T, Bachthaler M, Bross K, Freund S and Andreesen R: Anti-inflammatory and angiostatic therapy in chemorefractory multisystem Langerhans' cell histiocytosis of adults. *Br J Haematol* 128:730-732, 2005.
227. Reichle A, Vogt T, Coras B, Terheyden P, Neuber K, Trefzer U, Schultz E, Berand A, Brocker EB, Landthaler M and Andreesen R: Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res* 17:360-364, 2007.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP 1	eIF4E binding protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromdesoxyuridin
CDK	Cyclin depending kinases
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGFR	Endothelial growth factor receptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FKBP 12	FK 506 binding protein 12
FKS	Fetales Kalbsserum
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HIF 1	Hypoxia Inducible Faktor 1
IGFR	Insulin-like growth faktor receptor
IL	Interleukin
MMP	Matrixmetalloproteinase
mTOR	mammalian target of Rapamycin
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NKT Zellen	Natürliche Killer T Zellen
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
p70 S6K1	40 S ribosomal protein p70 S6 Kinase
PBS	Phosphate buffered salin
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PI <sub>3</sub> K	phosphatidyl-inositol 3 kinase
PIP <sub>3</sub>	phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphate
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosom ten
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Rounds per minute
RXR	Retinoid X Rezeptor
TGF-β	Transforming growth factor
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1/2
TZD	Thiazolidindione
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **8.2 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Anika Christin Bundscherer
Geburtsdatum	05. 01. 1983
Geburtsort	Regensburg
Adresse	Marksteinstr. 9, 93161 Sinzing/ Eilsbrunn

### **Schulbildung**

1989 – 1993	Grundschule Sinzing
1993 – 2001	Von Müller Gymnasium Regensburg
2001	Abitur

### **Studium**

2001 – 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2003	ärztliche Vorprüfung
November 2008	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Approbation

### **Praktische Tätigkeiten**

#### **Auslandsaufenthalte**

10/2006	Notaufnahme, Chelsea and Westminster Hospital, London
04/2008	Pädiatrie, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

#### **Praktisches Jahr**

02/2007 – 06/2007	Chirurgie (Universitätsklinikum Regensburg)
06/2007 – 10/2007	Anästhesiologie (Universitätsklinikum Regensburg)
10/2007 – 01/2008	Innere Medizin (KH der Barmh. Brüder, Regensburg)

seit 01.01.2009	Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Regensburg
-----------------	---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen hilfsbereiten Menschen bedanken, die mich bei der Planung und Durchführung der Experimente unterstützt und so wesentlich zum Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Professor Dr. Thomas Vogt, für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die freundliche Betreuung und für die wohlwollende Unterstützung bei der Verwirklichung dieser Arbeit. Besonders gefreut habe ich mich über das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat, die Freiräume, die er mir bei der Umsetzung meiner Ideen gelassen hat, und über die Möglichkeit, über diese Arbeit hinaus Publikationen zu erstellen.

Meinem Betreuer PD. Dr. Christian Hafner danke ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit, die motivierenden Gespräche, die konstruktive Kritik und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für Probleme hatte und mir bei vielen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vielen Dank an den Lehrstuhlinhaber Prof. Dr. Michael Landthaler für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Lehrstuhl zu erstellen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Edward Geissler für die Ermöglichung der *in vivo* Experimente.

Ein großer Dank gilt Dr. Gudrun Köhl für die kompetente Beratung, die anregenden Diskussionen und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Angiogenese-Assays sowie die Hilfe bei den *in vivo* Experimenten.

Bei Dr. Bernd Becker und Dr. Tim Maisch bedanke ich mich für die große Unterstützung bei den FACS Analysen.

Weiterhin möchte ich Dr. Alexander Rösch, Lydia Künzel, Andrea Müller und Petra Weiderer für die vielen methodischen Ratschläge und die Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente danken.

### 8.3 Publikationen

#### Originalarbeit

Bundscherer, Hafner, Maisch, Becker, Landthaler and Vogt.  
*Antiproliferative and proapoptotic effects of rapamycin and celecoxib in malignant melanoma cell lines.* Oncol Rep. 2008; 19(2):547-53

#### Übersichtsarbeiten und Buchbeiträge

Bundscherer, Hafner, Vogt.  
*Stroma-targeted therapy: a new concept in tumor palliation.*  
Salud(i)Ciencia, 2007; 18(2)

Bundscherer, Hafner.  
*New indications for established drugs able to modify tumour-host interactions.*  
In: Tumour pathophysiology and therapeutic consequences, Springer Verlag, im Druck.

#### Kongressbeiträge (Poster)

Bundscherer, Hafner, Landthaler, Vogt.  
*Antiproliferative Effekte von Rapamycin und Celecoxib in Angiosarkomzellen.*  
ADO 2008

Bundscherer, Hafner, Landthaler, Vogt.  
*Wachstumshemmung und Apoptose-Induktion in Melanomzellen durch Rapamycin und Celecoxib.*  
ADO 2006

<http://www.spandidos-publications.com/or/19/2/547>

<http://www.journalonko.de/aktuellview.php?id=1325>

